

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ À
L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE

PAR

SERGE LAPLANTE

OPTIMISATION DE LA PRODUCTION DE LIGNINASES AVEC LE
CHAMPIGNON BASIDIOMYCETE *PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM*
(ATCC-24725)

FEVRIER 1994

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	viii
SOMMAIRE.....	xiii
INTRODUCTION.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	8
1. INTRODUCTION.....	9
2. LA LIGNINE.....	11
2.1. Rôles structuraux de la lignine du bois.....	13
2.2. Biosynthèse de la lignine.....	13
2.3. Composition de la lignine.....	14
3. MICROORGANISMES LIGNINOLYTIQUES.....	14
3.1. Champignons ligninolytiques.....	15
3.2. Bactéries ligninolytiques.....	16
3.3. Le plus caractérisé des champignons ligninolytiques: <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (ATCC-24725).....	17
4. LIGNINASES.....	18
4.1. Découverte des enzymes responsables de la biodégradation de la lignine: les ligninases.....	18
4.2. Le système ligninolytique de <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	19
4.3. Propriétés cinétiques et enzymologiques de l'isoenzyme H8 (LiP).....	22
4.4. Réactions biochimiques des ligninases.....	25
5. ROLES DES LIGNINASES DANS LA BIODEGRADATION DE LA LIGNINE..	26
5.1. Biodégradation de la lignine.....	26
5.2. Interaction entre les ligninases et le polymère de lignine.....	26
5.3. Mécanisme de biodégradation de la lignine avec l'isoenzyme H8 (LiP).....	27
5.4. Rôle oxydatif de l'oxygène dans la biodégradation de la lignine...	30
5.5. Cycle Redox et rôle de l'alcool vératrylique sur la ligninase LiP..	30
5.6. Rôles des peroxydases manganèse-dépendantes (MnP).....	31

5.7. Rôle de l'ion manganèse dans la biodgradation de la lignine.....	33
5.8. Production de peroxyde d'hydrogène par <i>P. chrysosporium</i>	34
6. PRODUCTION DE LIGNINASES AVEC <i>PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM</i>.....	35
6.1. Conditions naturelles pour la production de ligninases.....	35
6.2. Conditions de cultures pour la production de ligninases.....	36
7. ROLE ET EFFET DE DIVERS PARAMETRES DE CULTURE (CONDITIONS ET INGRÉDIENTS DU MILIEU) SUR LA PRODUCTION DE LIGNINASES ET LA LIGNINOLYSE.....	37
7.1. Conditions optimales de croissance (température et pH).....	37
7.2. Nécessité d'un co-substrat de la lignine pour la ligninolyse.....	38
7.3. Limitation nutritionnelle pour la production de ligninases.....	38
7.4. Rôle de l'oxygène sur la production de ligninases en cultures liquides.....	39
7.5. Rôle de l'alcool vératrylique (alcool 3,4 diméthoxybenzylique)..	41
7.6. Effet de l'ion manganèse (Mn^{2+}).....	42
7.7. Effet des éléments de trace et des vitamines.....	43
7.8. Effet de l'agitation en cultures liquides.....	45
7.9. Effet des détergents ou surfactants.....	47
7.10. Effet des lipides.....	49
7.11. Effet de la taille et de la concentration des pelotes mycéliales (en cultures liquides agitées).....	54
7.12. Comparaison de l'effet de la limitation en carbone ou d'azote en flacons agités.....	56
7.13. Effet du système de culture (conception du bioréacteur).....	58
7.14. Conditions ligninolytiques pour la biodégradation en fermentation à l'état solide (FÉS).....	61
8. OBJECTIFS DE RECHERCHE.....	61
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	63
1. MATÉRIELS.....	64
1.1. Micro-organisme.....	64
1.2. Substrats.....	64
1.3. Produits chimiques.....	64
1.4. Matériel de fermentation.....	64
1.5. Appareils.....	65
2. MÉTHODES.....	66
2.1. PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES.....	66
2.1.1. Cultures de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (ATCC-24725).....	66
2.1.2. Pureté des cultures.....	67

2.1.3.	Stérilisation.....	67
2.1.4.	Préparation de l'inoculum.....	67
2.1.4.1.	Ensemencement de l'inoculum.....	67
2.1.4.2.	Milieu inoculum.....	68
2.1.4.3.	Lavage et broyage mycérial de l'inoculum.....	70
2.1.5.	Fermentation à l'état liquide (FÉL) et fermentation à l'état solide (FÉS).....	70
2.1.5.1.	Ensemencement des milieux de fermentation.....	70
2.1.5.2.	Composition des milieux de fermentation pour la production de ligninases.....	71
2.1.5.2.1.	Composition des milieux Kirk et Jeffries pour la production de ligninases en cultures liquides agitées.....	72
2.1.5.2.1.	Composition des milieux de fermentation établis dans cette étude pour la production de ligninases.....	75
2.1.6.	Fermentation liquide de 10 litres en fermenteur à turbines conventionnel d'une capacité de 16 litres.....	76
2.1.7.	Fermentation liquide de 3 litres en mini-fermenteur artisanal (cuve en verre de 4 litres).....	78
2.1.8.	Récolte d'enzymes.....	80
2.2.	PROCÉDURES ANALYTIQUES.....	80
2.2.1.	Essais enzymatiques.....	80
2.2.1.1.	Activité lignine peroxydase (LiP).....	81
2.2.1.1.1.	Méthode pour les cultures liquides (FÉL).....	81
2.2.1.1.2.	Méthode pour les cultures à l'état solide (FÉS).....	82
2.2.1.2.	Activité peroxydase manganèse-dépendante (MnP).....	83
2.2.1.3.	Activité laccase.....	84
2.2.1.3.1.	Oxydation de l'ABTS.....	85
2.2.2.	Détermination des protéines.....	86
2.2.3.	Détermination du poids sec de la biomasse mycéliale des inocula.....	86
2.2.4.	Évaluation de la production de ligninases.....	86
2.2.4.1.	Calcul de l'activité ligninase.....	87
2.2.4.2.	Calcul de la productivité en ligninases.....	87
2.2.4.3.	Calculs d'erreur.....	87
	RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	89
1.	INTRODUCTION.....	90
2.	RÉSULTATS DE LA FERMENTATION À L'ÉTAT LIQUIDE (FÉL).....	90
2.1.	Formulation d'un milieu standard pour l'étude de l'effet divers paramètres sur la production de ligninases.....	90
2.2.	Effet de différentes concentrations de glucose sur la production de ligninases (milieu standard).....	96
2.3.	Effet de la concentration de glycérol sur la production de ligninases (milieu standard sans glucose).....	98

2.4.	Effet de différentes concentrations de PEG 6000 sur la production de ligninases (milieu standard et C-limitant).....	99
2.5.	Effet des Tweens sur la production de ligninases (milieu standard et C-limitant).....	104
2.6.	Effet de la combinaison de surfactants et lipides sur la production de ligninases (milieu standard sans glucose).....	107
2.7.	Effet de différentes sources de lipides (0,35%) sur la production de ligninases (milieu C-limitant, [Mn] = 11,1 ppm).	111
2.8.	Effet de différentes concentrations d'huile de canola sur la production de ligninases (milieu C-limitant, [Mn] = 40 ppm).	113
2.9.	Effet de différentes concentrations de copeaux de bois sur la production de ligninases (milieu standard).....	115
2.10.	Effet de différentes tailles de copeaux de bois sur la production de ligninases dans diverses conditions.....	118
2.11.	Effet de diverses sources d'azote organique sur la production de ligninases (milieu standard).....	123
2.12.	Effet de différentes concentrations d'azote inorganique (diammonium tartrate) sur la production de ligninases (milieu standard, [glucose] variable, +/- extrait de levure).....	130
2.13.	Effet de la concentration de diammonium tartrate sur la production de ligninases (milieu C-limitant, [Mn] = 40 ppm)....	135
2.14.	Effet de l'eau du robinet et des éléments de trace sur la production de ligninases (milieu standard).....	135
2.15.	Effet de différentes concentrations en ion Mn^{2+} sur la production de ligninases (milieu standard et C-limitant).....	139
2.16.	Effet de différentes concentrations en alcool vératrylique sur la production de ligninases (milieu standard et C-limitant).....	142
2.17.	Effet de diverses préparations de lignines commerciales sur la production de ligninases (milieu standard).....	145
2.18.	Effet de diverses formes et concentrations d'inoculum sur la production de ligninases (milieu standard et C-limitant).....	147
2.19.	Effet de l'utilisation de divers tampons et concentrations en Mn^{2+} sur la production de ligninases (milieu C-limitant)...	157
2.20.	Détermination des conditions optimales (aération, agitation, température) sur la production de ligninases (milieu standard).....	162
2.21.	Comparaison des meilleurs résultats obtenus à partir des milieux standard et C-limitant optimisés en flacons agités.....	168
2.22.	Comparaison des meilleures activités ligninases obtenues en laboratoire avec le milieu optimal (C-limitant) et les milieux rapportés par Kirk et par Jeffries.....	171
2.23.	Production de ligninases en volume de culture de 3 litres dans un mini-fermenteur artisanal de 4 litres avec le milieu optimal.....	177
3.	RÉSULTATS DE LA FERMENTATION A L'ÉTAT SOLIDE (FÉS).....	184
3.1.	INTRODUCTION.....	184
3.2.	Effet des nutriments et de divers tampons sur la production de ligninases (milieu standard).....	186

3.3.	Effet du malonate et de l'ion Mn^{2+} sur la production de ligninases (milieu standard avec [Tween 80] = 0,05%).....	189
3.4.	Effet de la concentration des ingrédients du milieu sur la production de ligninases (milieu standard [Mn] = 40 ppm).....	191
3.5.	Effet de la dilution de la quantité des ingrédients dans le milieu standard et comparaison de l'effet des copeaux de bois et du bois moulu (20 mesh) sur la production de ligninases.....	193
3.6.	Effet de diverses sources d'azote organique sur la production de ligninases.....	195
3.7.	Effet de diverses concentrations d'huile d'olive sur la production de ligninases.....	198
4.	COMPARAISON DE LA PRODUCTION DE LIGNINASES EN FÉS ET FÉL.....	200
5.	RAPPEL DES OBJECTIFS DE CETTE ÉTUDE.....	203
	CONCLUSION.....	205
	BIBLIOGRAPHIE.....	209
	REMERCIEMENTS.....	229
	ANNEXE.....	230

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Comparaison des meilleures activités ligninases rapportées par d'autres auteurs avec celles obtenues avec nos conditions (cultures liquides agitées) avec <i>P. chrysosporium</i> ATCC-24725.....	173
Tableau 2	Comparaison des activités ligninases obtenues en laboratoire avec les conditions rapportées et nos conditions optimales (cultures liquides agitées) avec <i>P. chrysosporium</i> ATCC-24725.....	178
Tableau 3	Comparaison des meilleures activités LiP obtenues et celles rapportées avec divers mutants de <i>P. chrysosporium</i> ATCC-24725.....	179
Tableau 4	Résultats de la production de ligninases en volume de culture de 3-L en mini-fermenteur artisanal de 4-L avec <i>P. chrysosporium</i> ATCC-24725.....	182
Tableau 5	Effet des nutriments et de divers tampons sur la production de ligninases.....	187
Tableau 6	Effet du malonate et de l'ion manganèse sur la production de ligninases.....	190
Tableau 7	Effet de la concentration du milieu sur la production de ligninases (milieu standard, [Mn]= 40 ppm).....	192
Tableau 8	Effet de la quantité de nutriments du milieu et comparaison de l'effet des copeaux de bois (~30 mm ³) et du bois moulu (20 mesh) sur la production de ligninases (milieu standard, [Mn]= 40 ppm).....	194
Tableau 9	Effet de diverses sources d'azote organique sur la production de ligninases (milieu standard, [Mn]= 40 ppm).	197
Tableau 10	Effet de diverses concentrations d'huile d'olive sur la production de ligninases (milieu standard, sans glucose, [Mn]= 40 ppm).....	199
Tableau 11	Comparaison des meilleurs résultats obtenus en fermentation à l'état liquide (FÉL) et en fermentation à l'état solide (FÉS) sur la production de ligninases avec <i>P. chrysosporium</i> ATCC-24725.....	202

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Schéma de la structure de la lignine.....	12
Figure 2	Profil FPLC illustrant les 10 isoenzymes différents de ligninases du système ligninolytique de <i>P. chrysosporium</i> ATCC-24725.....	21
Figure 3	Cycle catalytique de la ligninase LiP (H8).....	24
Figure 4	Schéma illustrant l'action de la ligninase LiP sur les composés-modèles β -1 et β -0-4.....	29
Figure 5	Schéma du mini-fermenteur artisanal en cuve de 4-L utilisé pour la production de ligninases.....	79
Figure 6	Comparaison du milieu Kirk original (azote limitant) avec le milieu Kirk azote-limitant modifié (2% copeaux de bois) pour la production de ligninases.....	92
Figure 7	Effet de la concentration de glucose sur la production de ligninases (milieu standard).....	95
Figure 8	Effet de la concentration de glycérol sur la production de ligninases (milieu std., 0% glucose).....	98
Figure 9	Effet de la concentration de Polyéthylène-glycol (PEG 6000) sur la production de ligninases (milieu std.)..	102
Figure 10	Effet de la concentration de Polyéthylène-glycol (PEG 6000) sur la production de ligninases (milieu C-limitant, [Mn]= 40 ppm).....	103
Figure 11	Effet de divers surfactants (concentrations optimales) sur la production de ligninases (milieu standard).....	105
Figure 12	Effet de divers surfactants sur la production de ligninases (milieu C-limitant, [Mn]= 40 ppm).....	106
Figure 13	Effet de diverses combinaisons de surfactants et lipides sur la production de ligninases (milieu standard sans glucose).....	109
Figure 14	Effet de divers types d'huiles (0,35%) sur la production de ligninases (milieu C-limitant).....	112

Figure 15	Effet de la concentration d'huile de canola (% p/v) sur la production de ligninases (milieu C-limitant, [Mn]= 40 ppm).....	114
Figure 16	Effet de la concentration de copeaux de bois sur la production de ligninases (milieu standard, avec 0,5% glucose constant).....	116
Figure 17	Effet de la taille des copeaux de bois (mesh) sur la production de ligninases (milieu standard).....	119
Figure 18	Effet de la taille des copeaux de bois sur la production de ligninases (milieu standard, 0% glucose).....	120
Figure 19	Effet de la taille des copeaux de bois sur la production de ligninases (milieu standard, 0,25% glucose et 0,66 g/L diammonium tartrate).....	121
Figure 20	Effet de la concentration d'extrait de levure sur la production de ligninases (milieu standard).....	126
Figure 21	Effet de diverses sources d'azote organique (concentrations optimales) sur la production de ligninases (milieu standard).....	128
Figure 22	Effet de la concentration en azote inorganique (diammonium tartrate) et de l'extrait de levure (2 g/L) sur la production de ligninases (milieu standard, 0% glucose).....	132
Figure 23	Effet de la concentration en azote inorganique (diammonium tartrate) et de l'extrait de levure (2 g/L) sur la production de ligninases (milieu standard, 0,5% glucose).....	133
Figure 24	Effet de la concentration de diammonium tartrate sur la production de ligninases (milieu C-limitant, [Mn]= 40 ppm).....	136
Figure 25	Effet de l'eau de robinet comme source d'éléments de traces pour la production de ligninases (milieu standard).....	138
Figure 26	Effet de la concentration en ions manganèse [Mn ²⁺] sur la production de ligninases (milieu standard).....	140
Figure 27	Effet de la concentration en ions manganèse [Mn ²⁺] sur la production de ligninases (milieu C-limitant).....	141
Figure 28	Effet de la concentration en alcool vératrylique sur la production de ligninases (milieu standard).....	144

Figure 29	Effet de l'addition de lignine (lignosol) sur la production de ligninases (milieu standard).....	146
Figure 30	Effet de la concentration (% p/v poids sec) d'inoculum mycéliel (broyat) sur la production de ligninases (milieu standard).....	148
Figure 31	Effet de la concentration (% p/v poids sec) d'inoculum mycéliel (broyat) sur la production de ligninases (milieu C-limitant).....	150
Figure 32	Effet de la concentration (nbre. de spores/litre milieu) de l'inoculum de spores sur la production de ligninases (milieu standard).....	151
Figure 33	Effet de la concentration (% poids sec) de mycélium sphérique sur la production de ligninases (milieu standard).....	153
Figure 34	Effet de divers types d'inoculum (concentrations optimales) sur la production de ligninases (milieu standard).....	155
Figure 35	Effet de divers tampons sur la production de ligninases (milieu C-limitant, [Mn]= 0,3 ppm).....	158
Figure 36	Effet de divers tampons sur la production de ligninases (milieu C-limitant, [Mn]= 11,1 ppm).....	159
Figure 37	Effet de divers tampons sur la production de ligninases (milieu C-limitant, [Mn]= 40 ppm).....	160
Figure 38	Effet de la température sur la production de ligninases (milieu standard).....	163
Figure 39	Effet de l'atmosphère sur la production de ligninases (milieu standard).....	164
Figure 40	Effet de la vitesse d'agitation sur la production de ligninases (milieu C-limitant, Tampon 2,2 DMS, [Mn]= 11,1 ppm).....	165
Figure 41	Comparaison des meilleurs résultats obtenus à partir des milieux standard et C-limitant optimisés pour la production de ligninases en flacons Erlenmeyer agités.....	169

Figure 42	Comparaison des meilleurs résultats obtenus en laboratoire avec le milieu Kirk N-limitant original et modifié (2% copeaux de bois) et le milieu standard et optimal (C-limitant, [Mn]= 40 ppm).....	174
Figure 43	Comparaison des meilleurs résultats obtenus en laboratoire avec le milieu Jeffries et le milieu optimal (C-limitant, [Mn]= 40 ppm).....	175
Figure 44	Résultats de la production de ligninases en volume de culture de 3-L dans un mini-fermenteur artisanal de 4 litres avec le milieu optimal (milieu C-limitant, [Mn]= 40 ppm).....	181
Figure 45	Activités spécifiques des ligninases produites durant la fermentation en mini-fermenteur artisanal de 4 litres.....	185

SOMMAIRE

Une grande demande en ligninases est envisagée dans un futur rapproché, non seulement pour délignifier les lignocelluloses utilisées comme matières premières pour la production de bio-combustibles, la pâte de papier, ou pour accroître la digestibilité des moulées animales, mais aussi pour leurs utilisations dans le bioblanchiment des pâtes de papiers, la détoxification des effluents d'usines papetières, et autres polluants récalcitrants environnementaux, et aussi pour la biotransformation de la lignine en produits chimiques à haute valeur. Cependant, le problème actuel est de produire suffisamment de ligninases à un coût abordable pour de telles applications industrielles.

Une des solutions à ce problème est l'optimisation de la production de ligninases par la mise au point des conditions de culture avec le champignon basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* (ATCC-24725), l'un des meilleurs producteurs de ligninases connu à ce jour. La majorité des études antérieures sur la production de ligninases ont été effectuées avec ce microorganisme. Ces études ont permis d'établir les caractéristiques principales des conditions ligninolytiques pour la production de ligninases, en utilisant des milieux liquides synthétiques à base de glucose comme source de carbone et d'énergie. Cependant, les niveaux d'activité rapportés à ce jour sont plutôt faibles.

Dans ce travail, nous avons étudié la production de ligninases: lignine peroxydase (LiP), peroxydase manganèse-dépendante (MnP), et/ou laccase, en fermentation liquide (en flacons agités), ainsi qu'en

fermentation à l'état solide, en utilisant *P. chrysosporium* (ATCC-24725) sous différentes conditions physiologiques. Nous avons établi les conditions optimales de production de ligninases selon une évaluation de l'activité maximale de chaque type de ligninase (LiP et MnP), et de leur productivité respective.

Les meilleures activités ligninases furent obtenues en fermentation à l'état liquide (flacons agités) avec copeaux de bois comme source principale de carbone et d'énergie. Les conditions optimales de production de ligninases ont été obtenues en milieu liquide limitant en carbone (sans glucose et sans extrait de levure), et ont permis de produire 1,111 U/mL d'activité LiP et 4,75 U/mL d'activité MnP, après 6 et 7 jours de fermentation, respectivement (1 U = 1 μ mol substrat oxydé/minute). Ce qui correspond à une productivité en ligninases de 0,185 U/mL.Jour et 0,679 U/mL.Jour, respectivement.

À partir de ces conditions optimales, nous avons augmenté l'échelle de production de ligninases en volume de culture de 3 litres en mini-fermenteur artisanal de 4 litres, et avons obtenu 0,685 U/mL d'activité LiP et 2,35 U/mL d'activité MnP, après seulement 4 jours de fermentation, correspondant à des productivités respectives de 0,171 U/mL.Jour et 0,588 U/mL.Jour. Ces résultats indiquent que l'augmentation de l'échelle de production de ligninases fut réalisée avec succès, puisque les productivités sont demeurées comparables à celles obtenues en flacons agités. Ceci suggère que la production de

ligninase est potentiellement réalisable à grande échelle avec un tel procédé.

Les connaissances acquises dans cette étude sont un bon point de départ pour une meilleure compréhension des besoins nutritionnels particuliers de *P. chrysosporium* (ATCC-24725) pour la production de ligninase en milieu à base de copeaux de bois comme source de carbone et d'énergie. Dans le futur, un tel procédé pourrait être envisageable pour simultanément biodélicnifier des matières lignocellulosiques et de produire des ligninases en quantités suffisantes pour diverses applications industrielles.

INTRODUCTION

La biomasse végétale (lignocelluloses) qui est constituée principalement de lignine, cellulose et d'hémi-cellulose, constitue le produit final majeur de tout carbone terrestre fixé par photosynthèse. Après la cellulose, la lignine est le second biopolymère carboné renouvelable le plus abondant sur terre. Il compte pour une large partie du carbone et de l'énergie que les végétaux captent à partir de l'énergie solaire, et il a été estimé que 25% de tout carbone fixé par photosynthèse est éventuellement transformé en lignine.

La lignine est un biopolymère non-linéaire constitué d'unités phénylpropanes (Adler, 1977) et joue un rôle important dans le recyclage du carbone, puisqu' il enveloppe la cellulose, la protégeant ainsi de l'attaque cellulasique des microorganismes (Freudenburg, 1968; Sarkanen, 1971). Cependant, la présence de ce polymère indocile est un obstacle pour l'utilisation efficace de la cellulose dans une foule de procédés industriels et biotechnologiques qui utilisent le bois, les pailles, ou les tiges comme matière première (Ericksson et al., 1990).

Un des problèmes majeurs est la nécessité d'effectuer des prétraitements dispendieux avant que la cellulose dans ces matières puisse être exposée à l'hydrolyse enzymatique. Ce problème a initié des études sur les microorganismes dégradeurs de lignine et aussi sur les enzymes possiblement impliquées, afin d'établir des procédés efficaces dans lesquels la biodégradation de la lignine devrait précéder la dégradation de la cellulose, mais aussi, afin de découvrir de nouvelles utilisations de la lignine comme source de produits

chimiques (Ander et Ericksson, 1978; Crawford et Crawford, 1980; Crawford, 1981; Zeikus, 1981; Janshekar et Fiechter, 1983).

Premièrement, il a été découvert que dans la nature, les champignons basidiomycètes (champignons à carie blanche du bois) sont des microorganismes dégradeurs de lignine particulièrement efficaces (Kirk, 1981; Kirk et Fenn, 1982). La raison est directement reliée à un système d'enzymes ligninolytiques uniques que ces champignons peuvent produire: les ligninases. Les ligninases sont définies comme étant un groupe d'isoenzymes de peroxydases à groupement hème et glycosylées, et responsables de la biodégradation oxydative de la lignine (Tien et Kirk, 1988). Deux principaux types de ligninases, isolées pour la première fois à partir de cultures liquides du champignon basidiomycète *Phanerochaete chrysosporium* (ATCC-24725) sont connues: les lignines peroxydases (LiP) (Glenn et al., 1983; Kirk et al., 1986a; Tien et Kirk, 1983; Tien et al., 1986) et les peroxydases manganèse-dépendantes (MnP) (Anderson et al., 1985; Asada et al., 1987; Hammel et al., 1985; Paszczynski et al., 1985). Parmi les champignons basidiomycètes, *Phanerochaete chrysosporium* (ATCC-24725) a été le plus étudié et demeure l'un des meilleurs dégradeurs de lignines et producteur de ligninases connu à ce jour (Tien et Kirk, 1983; 1984; Gold et al., 1984; Fenn et Kirk, 1979). Celui-ci fut isolé au début des années 70 (Burdshall et Eslyn, 1974), et a été le sujet d'intenses recherches comme modèle d'études des mécanismes biochimiques de la biodégradation de la lignine avec des composés-modèles (Kirk et al., 1975; Weinstein et al., 1980), la caractérisation

des ligninases (Gold et al., 1984; Tien et Kirk, 1984; Kirk et al., 1986a; Paszczyński et al., 1985), et aussi dans les études en cultures pour la production de ligninases (Kirk et Farrell, 1987). Depuis, la découverte des ligninases et de leurs propriétés uniques a créé un grand enthousiasme dans les communautés scientifiques et industrielles. En effet, une grande demande en ligninases est envisagée dans le futur, pour les applications suivantes (Tien, 1987):

- Dêlignification (prêtraitements biologiques) des lignocelluloses utilisées comme matières premières pour la production de bio-combustibles, de pâtes à papier, ou pour accroître la digestibilité de moulées animales (Blanchette et al., 1992; Reid, 1989).
- Bioblanchiment de la pâte à papier (Tran et Chambers, 1987).
- Dêtoxification des effluents d'usines de pâtes et papiers (chlorolignols, oligolignols) (Sundman et al., 1981; Huynh et al., 1985), et divers autres polluants environnementaux récalcitrants (BPC, PCP, DDT, benzo(a)pyrène, lindane) (Bumpus et al., 1985; Eaton, 1985; Haemmerli et al., 1986).
- Biotransformation de la lignine en produits chimiques à haute valeur (huiles, lubrifiants, chélateurs de métaux, vanilline, phénols, dispersants, DMSO) (Drew et al., 1978; Goldstein, 1975; Kirk et Chang, 1981).

Cependant, le facteur le plus limitant à de telles réalisations est la faible productivité de ligninases par le champignon basidiomycète *P.*

chryso sporium à grande échelle. Alors, pour remédier à ce problème, deux options possibles peuvent être envisagées: Une de ces options est le clonage moléculaire de ligninases (Gold et Alic, 1993), permettant de créer un microorganisme recombinant "hyperproducteur de ligninases". Avec cette option, la production de ligninases grâce aux techniques de l'ADN recombinant fait face à des problèmes d'insertion efficace d'un groupement hème dans la protéine clonée (Tien et Tu, 1987). Cependant, l'amélioration de la production de ligninases utilisant *P. chryso sporium* peut être plus facilement réalisable par la sélection de souches mutantes (Kirk et al., 1986a; Buswell et al., 1984). L'autre option implique la mise au point d'un milieu de culture et de conditions optimales pour la production de ligninases avec *P. chryso sporium* ATCC-24725, afin de développer un procédé efficace pour la production à grande échelle (industrielle) de ligninases.

Avec la dernière option, de nombreuses études antérieures ont démontré l'importance de l'influence des conditions de culture et des facteurs nutritionnels sur la production de ligninases. Premièrement, l'activité ligninolytique a été rapportée dans des cultures limitantes en substrats de croissance tels que l'azote, les hydrates de carbone et le soufre (Faison et Kirk, 1985; Shimada et al., 1981; Reid, 1983); sous une atmosphère saturée en oxygène au lieu de l'air (Kirk, 1987; Leisola et al., 1983a); l'alcool vératrylique, un métabolite secondaire de *P. chryso sporium* fut démontré comme étant un inducteur de la production de ligninases (Leisola et Fiechter, 1985 a,b; Faison et Kirk, 1985; Kirk et al., 1986a; Leisola et al., 1985). Une récente étude a

démontré l'effet régulateur de l'ion Mn^{2+} qui induit la production de MnP et réprime l'activité LiP à haute concentration, mais a l'effet inverse à faible concentration (Bonnamy et Jeffries, 1990).

Les ligninases ont été isolées pour la première fois à partir de cultures liquides stationnaires peu profondes en flacons Erlenmeyer de 125 mL (Kirk et al., 1978), puis en plateaux peu profonds (Faison et Kirk, 1985). Les premiers travaux ont démontré que l'agitation des cultures liquides (submergées) produisaient des pelotes mycéliales qui suppriment la formation d'activité ligninolytique (Kirk et al., 1978). Plus tard, Jäger et al. (1985) ont été les premiers à rapporter que l'addition de détergents en milieux agités permettait la production de ligninases, ce qui a donné de nouveaux espoirs pour la production de ligninases à grande échelle en fermenteurs conventionnels.

Diverses conceptions de réacteurs et de systèmes de fermentation ont été suggérés pour augmenter l'échelle de production de ligninases en utilisant soit des souches mutantes pouvant former un biofilm sur matières plastiques (Kirk et al., 1986a), ou en utilisant des pelotes mycéliales immobilisées sur matrices polymériques (Linko et al., 1987; Willershausen et al., 1987). Janshekar et Fiechter (1988) ont été les premiers à produire des ligninases à grande échelle en fermenteur conventionnel de 42 litres. Récemment, une production à l'échelle pilote d'une activité totale de ligninases de 1,5 million d'unités durant 1 mois fut réalisée en fermentation de 800 litres en utilisant un système fed-batch dans lequel *P. chrysosporium* a été

immobilisé sur un support fixe de 12 m² (Polvinen et al., 1991). Cependant, dans toutes ces études précédentes où des milieux synthétiques à base de glucose comme source de carbone et d'énergie ont été utilisés, les niveaux d'activités ligninases rapportées à ce jour ont été faibles.

Dans ce travail, nous avons étudié l'effet de diverses conditions de culture pour la production de ligninases (lignine peroxydases, et peroxydases manganèse-dépendantes) en fermentation submergée (flacons agités) et en fermentation à l'état solide en utilisant *P. chrysosporium* (ATCC-24725) en milieux à base de copeaux de bois comme source principale de carbone et d'énergie. Des niveaux supérieurs de ligninases ont été obtenus en utilisant des copeaux de bois dans les milieux de fermentation, comparativement à ceux rapportés dans la littérature. Avec les conditions optimales que nous avons établies, nous avons pu augmenter l'échelle de production de ligninases avec succès dans un fermenteur spécialement conçu à cette fin.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. INTRODUCTION

Depuis les débuts de la crise du pétrole, au début des années 70, un grand intérêt était tourné vers les utilisations biotechnologiques de matières lignocellosiques abondantes et renouvelables pour la production de nouvelles sources de combustibles. Par exemple, le bois, les pailles, ou tiges peuvent être bioconverties en éthanol. Vers le milieu des années 70, plusieurs conférences internationales sur la dégradation enzymatique de la cellulose ont été organisées, et les perspectives d'avenir étaient très optimistes. Cependant, il devint bientôt évident qu'un procédé biotechnologique utilisant le bois comme matière première n'est pas si facile à réaliser. Un des principaux problèmes était la nécessité d'effectuer des pré-traitements physico-chimiques dispendieux avant que la cellulose dans ces matières lignocellosiques puisse être exposée à l'hydrolyse enzymatique. La lignine était en majeure partie la cause du problème.

C'est pourquoi des activités de recherche permettant de trouver des applications biotechnologiques de la lignine ont été initiées à ce moment, particulièrement par Kent Kirk du Laboratoire des Produits Forestiers à Madison, Wisconsin (É.U.); par Karl-Erik Ericksson du Laboratoire Suédois des Produits Forestiers à Stockholm; et par Takayoshi Higushi de l'Institut de Recherche sur le Bois à l'Université de Tokyo (Japon). Depuis le premier séminaire international tenu en 1978, plusieurs revues sur la biodégradation de la lignine ont été écrites. Certaines d'entre-elles se concentraient sur les champignons

dégradeurs de lignine, et les enzymes possiblement impliquées (Ander et Ericksson, 1978), d'autres se concentraient sur les mécanismes, la physiologie et la biochimie de la biodégradation, incluant les divers microorganismes pouvant dégrader et transformer la lignine, et aussi les applications de la lignine (Crawford, 1981; Zeikus, 1981; Higuchi, 1982; Janshekar et Fiechter, 1983).

Kirk (Kirk, 1981; Kirk et Fenn, 1982) fut le premier à discuter du système ligninolytique des basidiomycètes, incluant *Phanerochaete chrysosporium*. Un an plus tard, en 1983, Kirk (Tien et Kirk, 1983) et Gold (Glenn et al., 1983) ont découvert la première enzyme responsable de la ligninolyse, nommée "la ligninase", à partir de cultures liquides du champignon basidiomycète *Phanerochaete chrysosporium* ATCC-24725. Deux ans plus tard, Paszczynski et al. (1985) ont caractérisé un autre type de ligninase du même microorganisme, la peroxydase manganèse-dépendante. La découverte de ces enzymes uniques a amené les revues ultérieures à se concentrer autant que possible sur certains nouveaux développements dans les mécanismes de biodégradation de la lignine par les champignons à carie blanche (Leisola et Fiechter, 1985b), particulièrement avec *P. chrysosporium* comme système de référence (Schoemaker et Leisola, 1990). Cela a aussi amené l'étude de la biodégradation de la lignine au niveau moléculaire, et aussi plusieurs études en cultures et à grande échelle de production de ligninases, afin d'étudier leurs propriétés et leurs applications possibles.

Depuis, la découverte des ligninases et de leurs propriétés uniques a créé un grand enthousiasme auprès de la communauté scientifique et industrielle. En effet, une grande demande en ligninases est envisagée dans un futur rapproché pour diverses applications (Tien, 1987). Cependant, le facteur limitant actuellement pour de telles réalisations est la faible productivité de ligninases par le champignon basidiomycète *P. chrysosporium* à grande échelle.

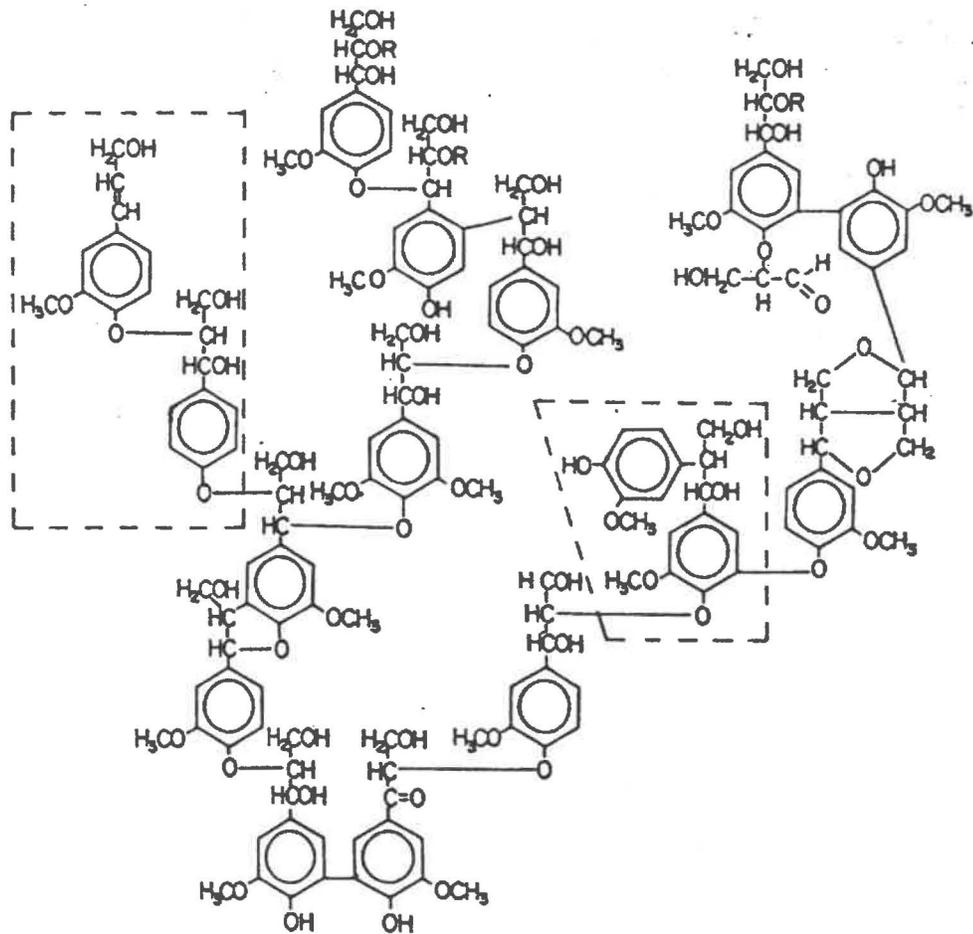
Dans cette revue littéraire, nous discuterons dans une première partie de la lignine, de son rôle, et des propriétés des ligninases, et dans la seconde partie, nous discuterons des conditions de cultures qui affectent la production de ligninases.

2. LA LIGNINE

La lignine est l'un des trois principaux constituants du bois et autres matières lignocellulosiques (bois, pailles, tiges, etc.). C'est le deuxième biopolymère terrestre le plus abondant après la cellulose. Près de 25% de tous les atomes de carbone fixés par photosynthèse sont convertis en lignine. La lignine est un biopolymère polyphénolique et tridimensionnel, composé d'unités phénylpropanes liées de façon désordonnée et tridimensionnellement (Adler, 1977) par des liaisons éther ou carbone-carbone entre cycles aromatiques (Adler, 1977; Leisola et Fiechter, 1985b; Tien, 1987) (Fig. 1).

Figure 1

Schéma de la structure de la lignine (de conifère). La liaison entre sous-unités de type β -O-4 (encadrée dans la boîte en pointillés à gauche) est prédominante. La liaison entre sous-unités encadrée dans la boîte en pointillés à droite est représentative de la liaison de type β -1.



2.1. Rôles structuraux de la lignine du bois.

La lignine agit comme une substance adhésive entre les autres composantes du bois (cellulose, hémi-cellulose), et confère une certaine rigidité dans la structure du bois, mais le rôle principal de la lignine est d'agir comme barrière protectrice contre l'attaque microbienne sur la cellulose, puisqu'elle entoure étroitement les fibres de cellulose et d'hémi-cellulose, les rendant inaccessibles aux cellulases microbiennes (Freudenburg, 1968; Sarkanen et Ludwig, 1971). La lignine peut aussi former une grande réserve d'énergie pour les besoins de la plante (Leisola et al., 1984a).

2.2. Biosynthèse de la lignine.

Le polymère de lignine est particulièrement complexe et de structures variées, dépendamment de sa source (Sarkanen, 1971). La structure aléatoire de la lignine est le résultat d'un mécanisme biosynthétique de polymérisation radicalaire à partir de radicaux phénoxy de monomères phénylpropanes formés avec les peroxydases qui originent de la plante, produites lors de l'épaississement de la paroi cellulaire (Crawford et Crawford, 1976). Diverses liaisons de polymérisation peuvent être formées, dû aux diverses formes de résonance électronique des radicaux de monomères. Dans le polymère de lignine, le type prédominant de liaison entre monomères rencontré est le type β -0-4 (60% des liaisons entre monomères dans la lignine d'épinette) (Adler, 1971). Le deuxième type en importance est la

liaison β -1 (5%). Les autres types sont moins abondants et sont de types variés (10 types connus) (Adler, 1971) (Voir figure 1 pour la structure de la lignine coniférique et de ses liaisons).

2.3. Composition de la lignine.

Chez les bois mous (conifères), la composante en lignine est plus élevée que chez les bois durs (arbres feuillus), et la composition de la lignine est différente dépendamment de sa source: les monomères phénylpropanes formant la lignine sont des alcools para-hydroxycinnamiques. Trois types de ces alcools sont retrouvés dans tous les types de lignines dans la nature (alcools conifériques, synapiques, et coumariques) (Sarkanen, 1971). La proportion de ces alcools détermine le type de lignine qu'ils composent: par exemple, chez les bois mous, le principal composant de la lignine est l'alcool coniférique. Chez les bois durs, c'est un mélange d'alcools conifériques et sinapiques, et dans les herbes, c'est un mélange des trois types d'alcools.

3. MICROORGANISMES LIGNINOLYTIQUES

La biodégradation complète de la lignine en CO_2 et H_2O (minéralisation) par les microorganismes doit être un processus efficace dans la biosphère puisqu'aucune accumulation détectable n'a lieu dans la nature. La minéralisation de la lignine peut être un résultat de l'action simultanée (coopération) de diverses espèces

fongiques (champignons) ou bactériennes (Janshekar et Fiechter, 1983), ou de l'action unique de certains types de fungus (champignons) formant la carie du bois. Dans le premier cas, chaque espèce de microorganisme est capable de dégrader partiellement la lignine, alors que dans le dernier cas, ils sont capables d'effectuer la biodégradation complète de la lignine. Actuellement, plusieurs microorganismes sont reconnus pour leur capacité de modifier partiellement ou de métaboliser les molécules solubles dérivées de la lignine. Cependant, la biodégradation extensive de la lignine semble être possible principalement sous l'action de certains champignons à carie (pourriture) du bois. (Leisola et Fiechter, 1985 b).

3.1. Champignons ligninolytiques.

Les champignons ligninolytiques sont divisés en trois catégories, dépendamment du type de carie qu'ils causent sur le bois:

- Les champignons à carie blanche (Classe des basidiomycètes)
- Les champignons à carie brune (Classe des basidiomycètes)
- Les champignons à carie molle (Classe des ascomycètes)

Les champignons à carie blanche du bois sont les dégradeurs de lignine les plus efficaces connus à ce jour. Ils sont principalement responsables de l'attaque primaire sur le bois, et peuvent minéraliser jusqu'à 50-60% de la lignine de bois mou. De plus, ils peuvent dégrader aussi efficacement et rapidement toutes les trois

composantes du bois (Kirk et Fenn, 1982). Les champignons à carie brune sont principalement responsables de la dégradation des polysaccharides et de l'humidification du bois. Ils sont reconnus comme étant de faibles dégradeurs de lignine et ne peuvent ouvrir les cycles aromatiques, donc, ne peuvent minéraliser la lignine. Les champignons à carie molle sont responsables de l'amollissement sur la surface du bois. On les retrouve surtout chez les bois durs (Ander et Eriksson, 1978). Tout comme les champignons à carie brune, les champignons à carie molle ne causent aussi qu'une faible dégradation de la lignine, et ils ne peuvent minéraliser seulement 1-8% de la lignine (Hatakka et Uusi-Rauva, 1983).

Certains champignons ligninolytiques ont été isolés récemment par Fukuzumi et al. (1983); Hattakki, (1983) et Agosin et al. (1985). Certaines nouvelles espèces de champignons à carie blanche, incluant *Pycnoporus cinnabarinus* et *Phlebia radiata* ont été démontrés comme étant d'aussi bons dégradeurs de lignine que le champignons à carie blanche le plus connu actuellement, c'est-à-dire le basidiomycète *Phanerochaete chrysosporium*.

3.2. Bactéries ligninolytiques.

Les bactéries jouent un rôle secondaire dans la biodégradation de la lignine. La majorité des bactéries ligninolytiques ne peuvent seulement métaboliser que des monomères solubles de lignine de faible poids moléculaire. Leur métabolisme des monomères

aromatiques a été révisé par Crawford (1981). Très rares sont les espèces pouvant attaquer directement le polymère de lignine, et là encore, le taux et l'efficacité de dégradation sont modestes comparativement aux champignons à carie blanche.

3.3. Le plus caractérisé des champignons ligninolytiques:

Phanerochaete chrysosporium (ATCC-24725).

L'un des plus efficaces et le plus étudié des microorganismes dégradeurs de lignine à ce jour est le champignon basidiomycète *Phanerochaete chrysosporium* ATCC-24725 (BKM-F-1767), anciennement nommé *Sporotrichum pulverulentum*, isolé au début des années 70 (Burdsall et Eslyn, 1974). Ce fungus fut étudié intensivement comme modèle d'études physiologiques et biochimiques de la biodégradation de la lignine (Tien et Kirk, 1983; 1984; Gold et al., 1984), de la caractérisation des enzymes responsables de la ligninolyse, et de la mise au point des conditions ligninolytiques en cultures pour la production de ligninases (Kirk et al., 1978; Fenn et Kirk, 1979).

4. LIGNINASES

4.1. Découverte des enzymes responsables de la biodégradation de la lignine: les ligninases.

En 1983, Tien et Kirk, et Gold et associés ont isolé et caractérisé pour la première fois une enzyme extracellulaire à partir de cultures ligninolytiques de *P. chrysosporium*: la ligninase. Cette enzyme avait la propriété unique de dépolymériser partiellement les lignines phénoliques et non-phénoliques, et aussi d'oxyder les composés-modèles synthétiques de lignine (dimères et monomères). La découverte de cette enzyme unique a permis l'étude de la biodégradation de la lignine (*in vitro*) à l'échelle moléculaire (Enoki et al., 1980; Burdsall et Esllyn, 1974; Tien et Kirk, 1983; 1984; Gold et al., 1984; Glenn et al., 1983).

Au début, la ligninase était considérée comme étant une oxygénase H₂O₂-dépendante, mais peu après (en 1985), il a été établi que cette enzyme soit dorénavant appelée "Lignine Peroxydase" dont l'abréviation est LiP (Harvey et al., 1985; Kuila et al., 1985; Renegathan et Gold, 1986). En 1988, il fut établi que "ligninase" est un nom générique utilisé pour désigner un groupe d'isoenzymes (peroxydases) produites en cultures ligninolytiques de *P. chrysosporium*, et isolées par chromatographie (Tien et Kirk, 1988). Donc, les ligninases correspondent au système ligninolytique de *P. chrysosporium*. Toutes ces isoenzymes sont extracellulaires, et sont

produites lors du métabolisme secondaire, en réponse à une limitation en carbone ou en azote (Tien et Kirk, 1983). On les appelle isoenzymes à cause de leurs grandes similarités structurales et fonctionnelles: glycoprotéines à groupement hème, de structures primaires et tridimensionnelles similaires, spectres similaires de réactivité sur des substrats, et poids moléculaires variant entre 38 Kd à 46 Kd, propriétés cinétiques (catalytiques) similaires: V_m et K_m .

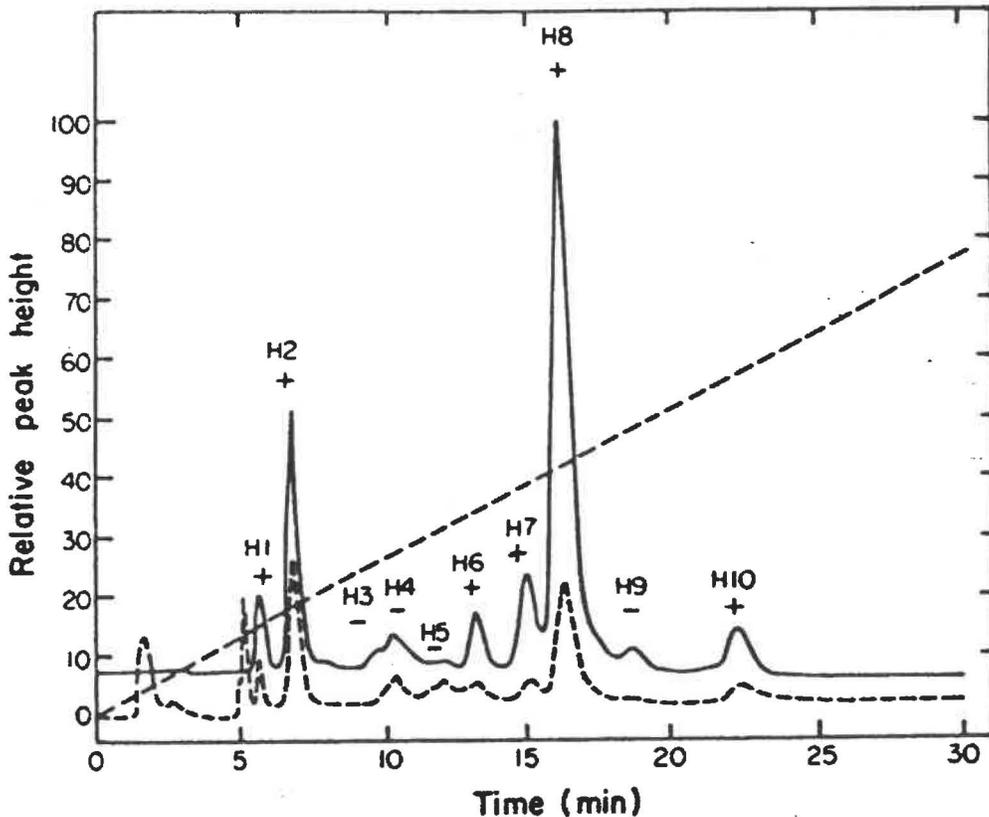
4.2. Le système ligninolytique de *Phanerochaete chrysosporium*.

Tien et Kirk (1988) ont produit, purifié et caractérisé le système complet de ligninases de *P. chrysosporium* (voir figure 2). Ce système ligninolytique inclut 10 isoenzymes différentes (H1 à H10), mais 6 d'entre elles ont une activité peroxydase envers un même substrat: l'alcool vératrylique (et divers dimères de lignine). Donc, celles-ci sont classifiées comme étant des peroxydases alcool vératrylique dépendantes (la famille des ligninases de type LiP), Ces isoenzymes sont: H1, H2, H6, H7, H8, et H10. Les autres isoenzymes (H3, H4, H5, et H9) sont classifiées comme étant des peroxydases manganèse-dépendantes (la famille des ligninases de type MnP), caractérisées par Glenn et Gold (1985) et par Paszczynski et al. (1986). Parmi toutes ces isoenzymes, la plus produite et la mieux caractérisée est l'isoenzyme H8, correspondant à la "ligninase" découverte initialement. Sous les conditions de croissance rapportées par Tien et Kirk (1988) (i.e. milieu

limitant en azote de Kirk), il a été démontré que l'abondance relative de chaque isoenzyme, tel que déterminé par le profil d'isoenzymes par chromatographie FPLC (voir Fig. 2), varie dépendamment de la concentration de certains additifs dans le milieu de culture, tel l'alcool vératrylique, ainsi qu'une solution d'éléments en trace (Kirk et al., 1985). Dans les conditions sélectionnées, environ 70% de toutes les isoenzymes produites étaient de type H8, suivi par H2 (25%). L'abondance relative totale des MnP était seulement d'environ 5%, et chaque autre isoenzyme était seulement présente à l'état de traces. Des études ultérieures effectuées par Bonnarme et Jeffries (1990) ont démontré que le profil d'isoenzymes peut varier drastiquement, dépendamment du niveau de manganèse dans le milieu. Ils ont observé que les isoenzymes de type LiP prédominent à faible (ou absente) concentration de manganèse, alors que les isoenzymes de type MnP prédominent à concentrations normales ou élevées en manganèse dans le milieu.

Figure 2

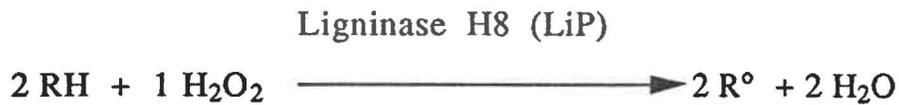
Profil FPLC des isoenzymes de ligninases de *P. chrysosporium* ATCC-24725 isolées à partir d'un concentrat de liquide extracellulaire de cultures liquides stationnaires après 5 jours d'incubation. Les pics sont numérotés selon leur ordre d'élution, correspondant au nom de chaque isoenzyme. Les isoenzymes ayant une activité LiP (peroxydases alcool vératrylique-dépendantes) sont indiquées par un (+) et les peroxydases manganèse-dépendantes par un (-). (Ref.: Kirk et al., 1986).



4.3. Propriétés cinétiques et enzymologiques de l'isoenzyme H8 (LiP).

L'isoenzyme H8 (LiP) fut la première isolée et aussi la plus caractérisée des ligninases par Tien et Kirk (1983). La majorité des études cinétiques et chimiques ont été effectuées avec cette isoenzyme (Tien et al., 1986; Chance, 1952). Il a été démontré que H8 peut catalyser l'oxydation d'une large gamme de substrats en produits variés (Tien et Kirk, 1983; 1984; Gold et al., 1984; Glenn et al., 1983; Renegathan et al., 1986; Kirk et al., 1986 b,c) qui peuvent subir de nouvelles étapes d'oxydation par la même enzyme. Cependant, pour les études cinétiques, un substrat doit subir qu'une seule oxydation. C'est le cas de l'alcool vératrylique. La cinétique d'oxydation de l'alcool vératrylique par H8 est bien établie (Tien et al., 1986): c'est une cinétique normale (Michaelis-Menten) pour H_2O_2 et le substrat. Le mécanisme de réaction est de type "ping-pong", lequel peut être expliqué par le cycle catalytique suivant de la LiP H8 (voir Fig. 3): Premièrement, le H_2O_2 (substrat 1) réagit avec l'enzyme native pour former un état modifié (oxydation de 2 électrons) de l'enzyme (composé I), lequel à son tour libère le produit 1. Ensuite, l'alcool vératrylique (substrat 2) réagit à son tour avec l'enzyme modifiée (composé I) pour subir une oxydation d'un électron, ce qui donne le produit 2 (cation radicalaire de l'alcool vératrylique), et l'état oxydé d'un électron pour l'enzyme (composé II). L'enzyme retourne à sa forme native en effectuant une seconde oxydation d'un électron sur une deuxième molécule d'alcool vératrylique. Les radicaux libres

cationiques d'alcool vératrylique ainsi générés par la ligninase peuvent alors oxyder la molécule de lignine ou ses dérivés, par diverses oxydations non-spécifiques d'un électron, lesquelles sont déterminées par la susceptibilité d'une fonction chimique à l'oxydation, laquelle est à son tour dépendante de la nature des substitués environnants. Et, le type de transformation chimique au niveau des substitués est dépendant de la stabilité du ou des produits formés. Donc, l'équation chimique balancée de la réaction de la ligninase H8 (LiP) est:

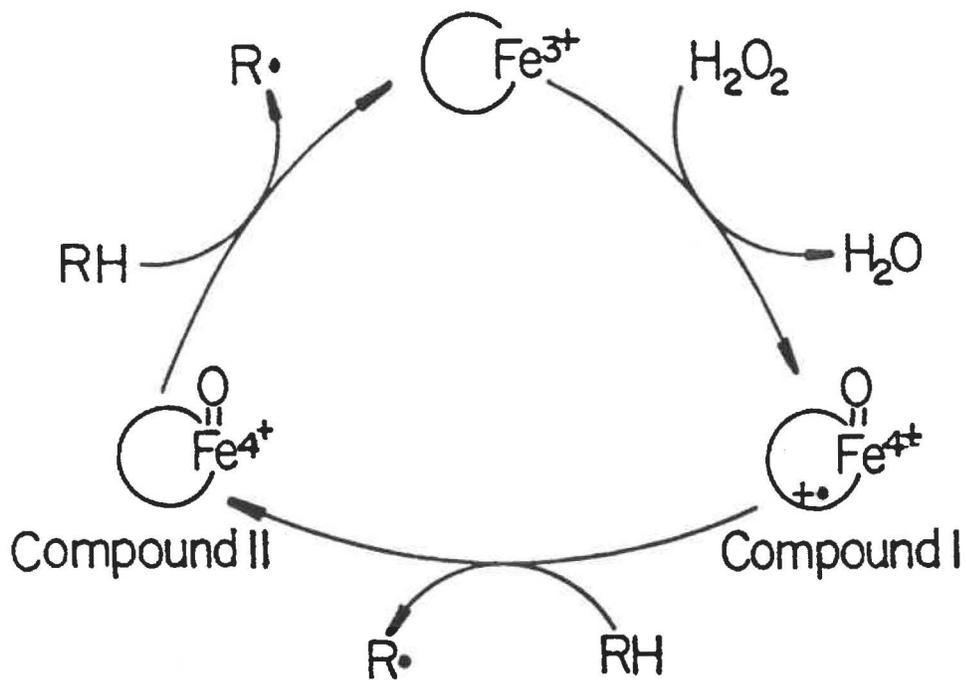


où R = substrat de la ligninase (alcool vératrylique, ou autres).

R[°] = cation libre radicalaire du substrat (oxydé d'un électron).

Figure 3

Cycle catalytique de la ligninases (LiP) montrant les différents états d'oxydation du groupement hème de l'enzyme. L'enzyme native (au repos) réagit avec le H_2O_2 pour produire un intermédiaire oxydé de deux électrons (composé I). Ce composé I oxyde un substrat dérivé de la lignine (RH) (par exemple l'alcool vératrylique) pour donner un intermédiaire oxydé d'un électron (composé II) et un radical du substrat ($\text{R}\cdot$). Le composé II de l'enzyme retourne à sa forme native par l'oxydation d'une seconde molécule de substrat. Le radical libre de ($\text{R}\cdot$) peut alors effectuer une variété de réactions oxydatives sur la lignine.



4.4. Réactions biochimiques des ligninases.

Les ligninases ont la particularité de pouvoir oxyder un large spectre de substrats en produits variés, par divers types de réactions biochimiques. Ces réactions peuvent être divisées en 5 catégories (Tien, 1987; Schoemaker et Leisola, 1990):

- 1- Oxydation de benzylalcools en cétones correspondantes.
- 2- Clivages carbone-carbone d'oligolignols (dimères).
- 3- Hydroxylations.
- 4- Dimérisations ou polymérisations de phénols.
- 5- Déméthylations de groupements méthoxyles.

Tous ces mécanismes de réaction ont un point en commun: ce sont des mécanismes de réaction impliquant des radicaux libres cationiques dans la catalyse. Cela a été démontré avec des composés-modèles de la lignine (sous-structures de la lignine: monomères ou dimères).

Le mécanisme de réaction avec radicaux libres cationiques a été démontré et établi (Kersten et al., 1985; Hammel et al., 1985). Les ligninases ont aussi des activités O-déméthylase, impliquant un mécanisme biochimique unique avec peroxydase.

5. ROLES DES LIGNINASES DANS LA BIODÉGRADATION DE LA LIGNINE

5.1. Biodégradation de la lignine.

Parmi toutes les réactions de la ligninase sur la lignine, les plus importantes sont:

- Clivage $C\alpha - C\beta$ sur chaînes phénylpropanes (dépolymérisation et dédimérisation).
- Déméthoxylation (de méthoxybenzènes).
- Oxydation de groupements hydroxyles benzyliques en cétones correspondants.
- Fission de cycles aromatiques.

Ces réactions ont été démontrées avec des composés-modèles de la lignine, et toutes ces réactions sont catalysées par un mécanisme utilisant un intermédiaire radical libre cationique à partir d'un substrat.

5.2. Interaction entre les ligninases et le polymère de lignine.

Les ligninases ne réagissent pas directement sur la lignine, à cause de l'encombrement stérique à l'intérieur de ce biopolymère. Plutôt, les ligninases réagissent indirectement par catalyse à distance (catalyse à l'aide d'un médiateur chimique), hors du site catalytique

enzymatique: certains substrats (comme l'alcool vératrylique, ou l'ion manganèse), lorsque oxydés par les ligninases, forment des cations radicaux libres assez stables pour diffuser hors du site catalytique, et migrer à travers la lignine afin d'effectuer diverses oxydations non spécifiques de 1 électron sur la molécule de lignine, incluant les noyaux aromatiques. De cette façon, les produits de la ligninase agissent comme des médiateurs de la catalyse enzymatique des ligninases pour permettre la biodégradation de la lignine (Harvey et al., 1989; Gold et al., 1989).

5.3. Mécanismes de biodégradation de la lignine avec LiP (isoenzyme H8).

Le rôle général de LiP est l'oxydation des noyaux aromatiques non-phénoliques en radicaux cationiques correspondants (Kersten et al., 1985; Schoemaker et al., 1985). La réactivité chimique (type de substitution du substrat) et les conditions réactionnelles (pH, [O₂]) dirigent le type de réaction (Palmer et al., 1987; Kirk et Farrell, 1987; Buswell et Odier, 1987; Tien, 1987). Les réactions caractéristiques des cations radicaux produits par LiP sur la lignine et les composés-modèles de la lignine sont les suivants, et sont classifiés dans l'ordre des étapes oxydatives qui ont lieu habituellement dans la biodégradation de la lignine:

I) DÉPOLYMÉRISATION:

- Clivage C α -C β sur chaînes phénylpropanes, avec hydroxylation sur C β . (voir composé-modèle β -1 en Fig. 4)
- Clivage β -O-4 aryl ether, avec hydroxylation sur C β . (voir composé-modèle β -O-4 en Fig. 4)

II) Oxydation des substitués sur monomères de lignine:

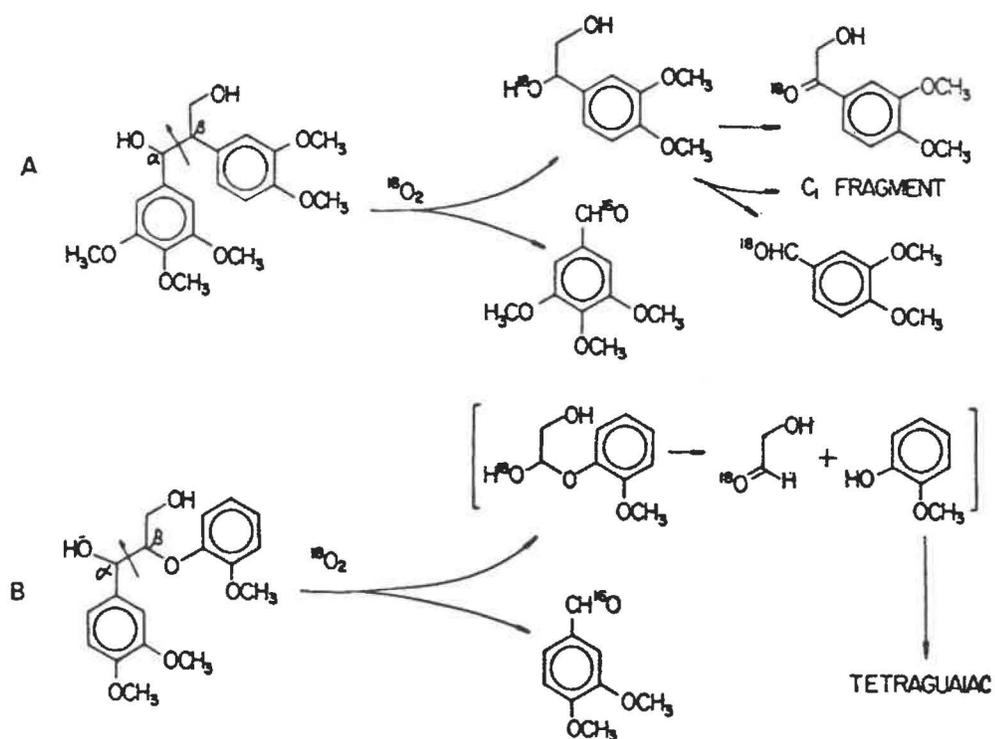
- Déméthoxylation.
- Hydroxylation.
- Décarboxylation.
- Couplage de phénols.
- Oxydation de groupements alcools en aldéhydes correspondants.
- Oxydation de groupements cétones en groupements acide carboxylique correspondants.

III) Fission de cycles aromatiques.

IV) Minéralisation (métabolisme primaire intracellulaire).

Figure 4

Schéma montrant l'action des ligninases sur les composés-modèles β -1 (A) et β -0-4 (B). La réaction prédominante avec les deux composés-modèles est le clivage $C\alpha$ -CB qui est accompagné simultanément d'une hydroxylation du CB sur la chaîne phénylpropane.



5.4. Rôle oxydatif de l'oxygène dans la biodégradation de la lignine.

La plupart des réactions catalysées par LiP génèrent des radicaux libres, lesquels à leur tour peuvent incorporer ou activer (i.e. réduire en anion superoxide) l'oxygène moléculaire. Donc, l'oxygène de l'air est incorporé en groupement hydroxyle au niveau du carbone C β après clivage C α -C β de liaisons β -1 et β -O-4 (tel que démontré sur composés-modèles dimériques), et l'anion superoxyde, lequel pouvant se dismuter en O₂ et H₂O₂, est formé via la réaction de O₂ avec les radicaux benzéniques hydroxy-substitués sous formation de groupements carbonyles correspondants (Hammel et al., 1985; Palmer et al., 1987; Haemmerli et al., 1987).

5.5. Cycle Redox et rôle de l'alcool vératrylique sur la ligninase LiP.

Il a été prouvé que les cations radicaux générés à partir du 3,4-diméthoxybenzyl alcool (alcool vératrylique, un métabolite secondaire naturel de la biodégradation de la lignine par *P. chrysosporium*) peuvent agir comme des médiateurs entre la ligninase et la lignine, comme nous l'avons expliqué précédemment, dû à l'encombrement stérique dans la lignine (Harvey et al., 1989). Plus récemment, il a été démontré (Marquez et al., 1988; Harvey et al., 1989) que l'alcool vératrylique a un autre rôle plus important: il a la propriété unique de

régénérer l'enzyme native (forme réduite). Dans le cycle Redox de LiP, l'enzyme native est oxydée de 2 électrons par le peroxyde d'hydrogène. Parfois, lorsque les substrats sont limitants, 2 molécules de H_2O_2 peuvent réagir sur la ligninase pour produire une forme inactive de l'enzyme (oxydée de 3 électrons). Alors, 3 molécules d'alcool vératrylique peuvent alors permettre 3 réductions successives de 1 électron, permettant de régénérer la forme native et le cycle catalytique actif de l'enzyme (Harvey et al., 1987; Wariishi et al., 1989; Cai et Tien , 1989).

5.6. Rôles des peroxydases manganèse-dépendantes (MnP).

Les isoenzymes de type peroxydases alcool vératrylique dépendantes (LiP), aussi bien que d'autres peroxydases sont produites en cultures ligninolytiques de *P. chrysosporium* : ce sont les peroxydases manganèse-dépendantes (MnP). Ces peroxydases correspondent aux isoenzymes H3, H4, H5, et H9 du système ligninolytique de ce fungus. Elles ont été isolées et caractérisées plus tard que les LiP (Paszczynski et al., 1985). Les MnP sont impliquées dans l'oxydation de lignines phénoliques (dépolymérisation), et de monomères de lignines phénoliques (oxydation de groupements phénoliques, particulièrement du type syringyl (3,5-diméthoxy-4-hydroxyphényl et substrats vinyl-substitués) (Paszczynski et al., 1986). Cependant, les MnP ne réagissent pas directement sur leurs substrats: comme nous en avons discuté précédemment avec LiP, les MnP utilisent aussi la catalyse de l'oxydation par médiation chimique,

mais dans ce cas-ci, c'est le seul moyen possible, puisqu'il n'y a pas de catalyse possible directement sur un substrat.

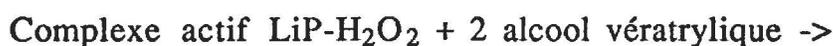
Les MnP réagissent comme suit: ils effectuent l'oxydation d'un électron de l'ion manganèse Mn^{2+} à la forme Mn^{3+} . Les nombres 2+ et 3+ réfèrent aux états d'oxydation. Le produit de la réaction, Mn^{3+} , est libéré du site actif de l'enzyme, et peut diffuser librement, où la plupart du temps sous la forme d'un complexe chélaté (Mn^{3+})-acide organique, à travers le polymère de lignine. Lorsque Mn^{3+} réagit sur la lignine, il effectue l'oxydation d'un électron sur les groupements phénoliques de la lignine, les convertissant en intermédiaires phénoxy (Gold et al., 1989). Par délocalisation électronique, cela produit un clivage entre $C\alpha$ - $C\beta$ sur groupements phénylpropanes, rendant possible la dépolymérisation au niveau des sous-structures phénoliques de lignine. Il en résulte une production de quinones et hydroquinones correspondantes. LiP peut aussi oxyder des groupements phénoliques, mais est rapidement désactivé dans ces conditions (Harvey et al., 1987). Donc, la coopération de LiP et MnP est synergique pour la biodégradation de la lignine, puisque MnP, dont la production apparaît un peu avant LiP en cultures ligninolytiques de *P. chrysosporium*, va oxyder les lignines et monomères phénoliques, alors que LiP va compléter la biodégradation par l'oxydation des lignines et monomères non-phénoliques de la lignine. LiP tout comme MnP, peut aussi réagir avec l'oxygène moléculaire (activité oxydase) pour produire le peroxyde d'hydrogène nécessaire, mais par des

mécanismes différents de ceux impliqués avec LiP (Pasczynski et al., 1985; Kuwahara et al., 1984).

5.7. Rôle de l'ion manganèse dans la biodégradation de la lignine.

L'ion manganèse est présent naturellement dans tous les types de bois, en concentrations variant entre 5 ppm et 1305 ppm (Young et Guinn, 1966). Cet élément de transition possède 7 états différents d'oxydation, dont certains sont potentiellement de très puissants oxydants (Turney, 1965). La chimie du manganèse a été documentée par Reed (1986). Il semble que l'ion manganèse joue un rôle important dans la biodégradation de la lignine. C'est un cofacteur essentiel (et substrat) de l'activité peroxydase manganèse-dépendante (MnP), une enzyme impliquée principalement dans la dépolymérisation oxydative de la lignine (lignine phénolique) (Wariishi et al., 1991). Le manganèse est aussi impliqué dans la régulation de la production de MnP (induction), laccase (Bonnarme et Jeffries, 1990), et LiP (répression) de *P. chrysosporium* et d'autres champignons à carie blanche du bois (Perez et Jeffries, 1992). Dans la réaction catalysée par MnP, Mn^{2+} est oxydé en Mn^{3+} , ce dernier est alors chélaté par un acide organique (α -hydroxy) et le complexe résultant peut diffuser hors du site catalytique vers la lignine pour y agir comme un oxydant diffusible (Glenn et Gold, 1985; Wariishi et al., 1988). Le Mn^{2+} est important dans le cycle catalytique de MnP puisque c'est le seul donneur d'électrons qui peut réduire l'état oxydé de MnP de retour vers la

forme réduite (forme native), permettant alors à MnP de répéter son cycle catalytique par de nouvelles oxydations de substrats (Wariishi et al., 1988; 1989). Ce rôle est similaire à celui de l'alcool vératrylique sur la lignine:



Le manganèse est aussi impliqué dans diverses réactions catalysées par LiP. Popp et al. (1990) ont rapporté l'oxydation de Mn^{2+} en Mn^{3+} par LiP en présence d'alcool vératrylique et d'acide oxalique, les deux étant des métabolites naturels de *P. chrysosporium*. L'oxydation de l'alcool vératrylique par LiP est stimulée par la présence de Mn^{2+} , mais seulement en présence de certains acides organiques pouvant chélater l'ion manganèse (Bono et al., 1990). Il a été finalement rapporté que le manganèse a un rôle important dans la minéralisation de lignines synthétiques.

5.8. Production de peroxyde d'hydrogène par *Phanerochaete chrysosporium*.

Comme nous le savons, le peroxyde d'hydrogène est nécessaire pour l'activité ligninase. C'est pourquoi *P. chrysosporium* a développé certains moyens de produire sa propre source de peroxyde

d'hydrogène. La production de H_2O_2 par *P. chrysosporium* est originaire du milieu intracellulaire et extracellulaire:

Origine intracellulaire: glucose-1-oxydase (Kelly et Reddy, 1986), et glucose-2-oxydase (Eriksson et al., 1986).

Production d'origine extracellulaire: l'anion superoxyde généré par LiP se dismute en H_2O_2 et H_2O (Kersten et Kirk, 1987; Kersten et al., 1989).

L'oxydation par glyoxal oxydase de fragments C1, C2, et C3 générés dans la biodégradation de la lignine produit aussi le H_2O_2 .

6. PRODUCTION DE LIGNINASES AVEC

PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM (ATCC-24725)

6.1. Conditions naturelles pour la production de ligninases.

Les basidiomycètes, en particulier les champignons à carie blanche (comme *Phanerochaete chrysosporium*) (Kirk, 1976), peuvent dégrader aussi efficacement toutes les trois composantes du bois (Kirk et Fenn, 1982). Afin de comprendre la physiologie de la ligninolyse, ainsi que les conditions ligninolytiques en cultures requises pour la production de ligninases, nous devons d'abord considérer l'habitat naturel d'évolution et de croissance de ces organismes: le bois.

Le bois contient un faible taux d'humidité et une faible pression partielle en oxygène, ainsi qu'une faible concentration en azote (limitation en azote). Même si le bois fournit des sources riches en

carbone telles que la cellulose et l'hémi-cellulose, ces deux composantes du bois sont entourées et protégées par la lignine contre l'attaque des cellulases et des hémi-cellulases de *P. chrysosporium*. Donc, cela crée une limitation en carbone qui induit la production de ligninases par ce fungus afin de se procurer ces substrats accessibles par ligninolyse (biodégradation de la lignine) (Leisola et Fiechter, 1985 b).

6.2. Conditions de cultures pour la production de ligninases.

Plusieurs études ont été effectuées en cultures liquides agitées ou stationnaires de *P. chrysosporium*, afin d'établir les caractéristiques principales des conditions ligninolytiques de culture pour l'étude de la biodégradation de la lignine (Kirk, 1976; Lundkist et al., 1977; Kirk et al., 1978; Kirk et Fenn, 1982) et aussi pour l'étude de la production de ligninases (Tien et Kirk, 1983; 1984; Faison et Kirk, 1985; Shimada et al., 1981), permettant de produire suffisamment de ligninases pour l'étude de leurs propriétés et aussi pour l'étude de la biodégradation de la lignine *in vitro* avec les ligninases purifiées.

Les premiers travaux dans ce domaine de recherche proviennent de T. Kent Kirk (De l'Institute for Microbial and Biochemical Technology, USDA Forest Products Laboratory, Madison, WI 53705), qui a fait une importante contribution. Ces études, en plus de celles de plusieurs autres chercheurs ont permis d'établir les caractéristiques suivantes des conditions de culture pour la production de ligninases

avec *P. chrysosporium* qui font de ce fungus aujourd'hui l'un des microorganismes ligninolytiques le plus connu.

7. ROLE ET EFFET DE DIVERS PARAMETRES DE CULTURE (CONDITIONS ET INGRÉDIENTS DU MILIEU) SUR LA PRODUCTION DE LIGNINASES ET LA LIGNINOLYSE

7.1. Conditions optimales de croissance (température et pH).

Kirk et al. (1978) ont établi la température optimale de croissance de *P. chrysosporium* dans les limites de 37-40°C, mais la plupart des études ont été effectuées à 39°C. Cependant, une étude récente (Perez et Jeffries, 1990) a démontré des activités ligninases ainsi que des taux de minéralisation de lignines synthétiques supérieurs à une température de 30°C. Ils ont aussi établi que la lignine est dégradée le plus rapidement à pH 4,0, même si la croissance est plus rapide à pH 5,0. Donc, la plupart des études sur la biodégradation de la lignine et la production de ligninases ont été effectuées à un pH intermédiaire (i.e. pH= 4,5) comme condition de pH optimal.

7.2. Nécessité d'un co-substrat de la lignine pour la ligninolyse.

Même si l'énergie potentielle contenue dans la lignine est supérieure à celle contenue dans la cellulose, il a été démontré que *P. chrysosporium* ou tout autre champignon à carie blanche est incapable d'utiliser (métaboliser) la lignine comme seule source de carbone et d'énergie. Nous devons donc lui fournir un co-substrat carboné (cellulose, glucose) pour permettre la ligninolyse (Jeffries et al., 1981; Ulmer et al., 1983). Cependant, l'accroissement du métabolisme de la lignine est directement relié à l'augmentation du taux de consommation du co-substrat (Leisola et al., 1983 b).

7.3. Limitation nutritionnelle pour la production de ligninases.

L'apparition d'activité ligninase a lieu lors d'une limitation ou épuisement en nutriments, tels que sources de carbone (glucose, cellulose) (Keyser et al., 1983; Jeffries et al., 1981; Leatham et Kirk, 1983; Kirk et al., 1986 a), ou sources d'azote (ammonium) (Fenn et Kirk, 1981), et/ou de soufre. Ces limitations sont reliées à l'apparition du métabolisme secondaire (Faison et Kirk, 1985; Schimada et al., 1981; Tien et Kirk, 1984).

De ces limitations, seulement la limitation en azote peut permettre une dégradation intensive de la lignine pure. Cependant,

lorsque des substrats lignocellulosiques sont utilisés sans aucune autre source d'énergie, la limitation en azote n'est pas strictement nécessaire pour la biodégradation de la lignine (Yang et al., 1980; Leisola et al., 1984 b). Probablement que la limitation en carbone dans le bois joue aussi un rôle dans la biodégradation de la lignine. Dans l'habitat naturel de croissance de *P. chrysosporium*, contenant de très faibles niveaux d'azote (limitation), il a été démontré que le fungus a la capacité de recycler ses propres réserves d'azote afin de régénérer de nouvelles croissances. Cela signifie que ce fungus peut croître même en l'absence de source d'azote, mais de façon limitée. Ces observations ont été établies avec les basidiomycètes en général (Merrill et Cowling, 1966), et observées en laboratoire aussi, par la formation d'excroissances de voiles mycéliaux (Ulmer et al., 1983 a), et même en eau distillée, dû aux réserves d'énergies du fungus.

7.4. Rôle de l'oxygène dans la production de ligninases en cultures liquides.

Dans la nature, le pourrissage du bois et la biodégradation de la lignine sont des processus oxydatifs lents, et la faible pression partielle en oxygène disponible est suffisante pour supporter les besoins du fungus. Mais, il a été démontré que le remplacement de l'air par une atmosphère saturée en oxygène stimule la biodégradation de la lignine par divers champignons à carie blanche, incluant *P. chrysosporium*, lorsqu'il se développe sur la paille ou sur le bois (Reid, 1989).

Il a été démontré que l'oxygène est nécessaire en cultures liquides pour stimuler la production de ligninases et la ligninolyse (Lundkist et al., 1977; Kirk et al., 1976 a; 1978). Lorsque le fungus est cultivé sous une atmosphère saturée en oxygène au lieu de l'air, les niveaux obtenus en ligninases et la biodégradation de la lignine (métabolisme oxydatif) (Kirk, 1987; Leisola et al., 1983 a,b), et l'épuisement du glucose (Reid et al., 1985) devinrent extrêmement plus élevés (Kirk et al., 1987; Leisola et al., 1983 a). La raison principale est liée à l'importance de la non-limitation en oxygène fourni dans le métabolisme oxydatif de la lignine.

Les premières études ont démontré que même dans des conditions saturées en oxygène, la formation de pelotes mycéliales en flacons agités a rendu le fungus incapable de dégrader la lignine. Cela a été associé aux faibles niveaux d'oxygène à l'intérieur des pelotes (Kirk et al., 1978), et aux interférences avec les réactions impliquant l'oxygène (Yang et al., 1980).

En augmentant le rapport surface/volume du milieu liquide en conditions stationnaires (non-agitées), une augmentation des taux de dégradation peut être atteinte (Ulmer et al., 1983 a,b; Leisola et al., 1983 a,b). Cela est, bien sûr, naturel puisque le voile mycéliel épais produit en conditions stationnaires rend difficile le transfert d'oxygène. Lorsqu'une couche ultra-mince de cellules fongiques est utilisée, la biodégradation de la lignine procède plus rapidement, même aux pressions partielles en oxygène inférieures à la pression

atmosphérique. De plus, l'oxydation du glucose en dioxyde de carbone est plus rapide en conditions saturantes en oxygène (Reid et al., 1985). L'oxygène moléculaire pourrait aussi agir comme un activateur (inducteur) des ligninases, mais le mécanisme n'est pas encore clair (Kirk et al., 1987; Leisola et al., 1983 a). En plus d'agir comme co-substrat dans la plupart des réactions oxydatives effectuées par les ligninases, l'oxygène moléculaire est converti par ces enzymes en anion superoxyde, lequel à son tour se dismute en peroxyde d'hydrogène, qui est un co-substrat nécessaire pour la catalyse des ligninases (Hammel et al., 1985; Haemmerli et al., 1987; Palmer et al., 1987).

7.5. Rôle de l'alcool vératrylique (alcool 3,4 diméthoxybenzylique) sur la production de ligninases.

Il a été bien établi que l'addition exogène d'alcool vératrylique dans le milieu peut stimuler la production de ligninases (peroxydases de type LiP) (Faison et Kirk, 1985; Kirk et al., 1986 a). L'alcool vératrylique est un métabolite secondaire naturel produit par le système d'enzymes ligninolytiques de *P. chrysosporium* (Harvey et al., 1986). Cependant, pour induire ce système ligninolytique, l'alcool vératrylique joue aussi un rôle important dans l'expression des gènes de ligninases (Faison et Kirk, 1986). Il joue aussi un rôle dans la biodégradation de la lignine, puisque en présence de lignine, il est oxydé en cation radicalaire, lequel pouvant agir comme médiateur radicalaire entre les ligninases et la lignine (Harvey et al., 1986). Il a

aussi été démontré que l'alcool vératrylique joue un rôle dans la stabilité du site catalytique de LiP contre l'inactivation par le peroxyde d'hydrogène (Harvey et al., 1987; 1989). Aussi, il a été démontré que la présence de lignine et de divers monomères et dimères dérivés de la lignine peut augmenter la production de LiP et du système ligninolytique en entier (Faison et Kirk, 1985; Leisola et al., 1984 a,b; Ulmer et al., 1984).

7.6. Effet de l'ion manganèse (Mn^{2+}).

Le rôle de l'ion Mn^{2+} , comme nous l'avons vu précédemment, est d'agir comme cofacteur essentiel de l'activité de la peroxydase manganèse-dépendante (MnP), une enzyme principalement responsable de la dépolymérisation oxydative de la lignine (Wariishi et al., 1991). De plus, comme l'alcool vératrylique pour LiP, l'ion manganèse agit aussi comme un médiateur radicalaire spécifique de MnP pour la biodégradation de la lignine (Wariishi et al., 1988; 1989). Il a été démontré que Mn^{2+} est impliqué dans la régulation de la production de ligninases (Bonnarme et Jeffries, 1990), incluant MnP (Bonnarme et Jeffries, 1990; Brown et al., 1990), laccase et LiP de *P. chrysosporium* et d'autres champignons à carie blanche (Perez et Jeffries, 1992). En effet, la présence de concentrations élevées (40 ppm) de manganèse dans le milieu augmente l'activité MnP, alors que la production de LiP est réprimée, jusqu'à ce que Mn^{2+} soit oxydé irréversiblement en MnO_2 . Il en résulte un délai dans l'apparition de la

production de LiP (Bonname et Jeffries, 1990). Cependant, à faibles concentrations de Mn^{2+} ($< 1,6$ ppm), la production de LiP est stimulée, alors que l'activité MnP est absente (Bonname et Jeffries, 1990). Dans les premières études de production de ligninases, Kirk et al. (1985) ont utilisé une concentration de manganèse d'environ 9-11 ppm. Le profil d'isoenzymes extracellulaires de ligninases produites est grandement affecté lorsque la concentration de Mn^{2+} est modifiée du niveau normal (11,15 ppm) à un niveau élevé (40 ppm): l'abondance des isoenzymes de type LiP (peroxydases alcool vératrylique dépendantes) est diminuée, alors que l'abondance des isoenzymes de type MnP devient prédominante (Bonname et Jeffries, 1990). Cependant, d'autres paramètres étudiés de fermentation, dont la concentration en protéines totales extracellulaires, le taux de consommation d'oxygène, et l'augmentation du poids sec de la biomasse mycéliale n'ont pas été affectées par les changements de concentration de l'ion manganèse (Bonname et Jeffries, 1990).

7.7. Effet des éléments de trace et des vitamines.

Une solution d'éléments de trace contenant 7 métaux de transition (solution basale d'éléments de trace de Kirk) (Kirk et al., 1986 a): Mn, Fe, Co, Zn, Cu, Mo, Al, s'est avéré bénéfique pour augmenter la production des isoenzymes de ligninases (Faison et Kirk, 1985; Leisola et al., 1985; Kirk et al., 1986 a). Le niveau basal (1x) d'éléments de traces utilisé était de 7 mL d'une solution d'éléments/litre de milieu, correspondant à une activité LiP de 0,0202

U/mL (1 unité = 1 μ mol substrat/minute). Sans alcool vératrylique dans le milieu, une augmentation de 1,7x l'activité basale a été observée lorsqu'un excès de 7x le niveau basal d'éléments de traces (49 mL/L milieu) a été utilisé, alors qu'en présence de 0,4 mM d'alcool vératrylique, une augmentation maximale de 4,7x l'activité basale (correspondant à 0,096 U/mL) fut observée. Cela suggère que l'effet combiné de ces deux additifs (alcool vératrylique et éléments de traces) est synergique sur la production de ligninases, puisque l'effet de l'addition de l'alcool vératrylique seul a permis d'obtenir une augmentation de 2,1x (0,0426 U/mL) l'activité basale. Aucune augmentation détectable de ligninases n'a eu lieu lorsque la concentration de l'un et/ou l'autre de ces additifs fut encore augmentée. Les métaux responsables de la stimulation de la production de ligninases ont été identifiés comme étant Cu^{2+} et Mn^{2+} .

L'eau de robinet a déjà été utilisée à la place de la solution d'éléments de traces, et a permis d'obtenir des activités ligninases comparables dans une production de ligninases à grande échelle (Janshekar et Fiechter, 1988). Cependant, en cultures stationnaires, la solution d'éléments de traces est essentielle, et aucune analyse de la composition de l'eau de robinet utilisée n'a été rapportée.

L'effet favorable de la thiamine est impliqué dans le métabolisme fongique et la croissance plutôt que directement sur la production de ligninases, puisqu'il est bien connu que cette vitamine

est impliquée comme coenzyme dans la décarboxylation oxydative (Rose, 1966; Rhodes et Fletcher, 1966).

7.8. Effet de l'agitation sur la production de ligninases en cultures liquides.

Les premières expériences de production de ligninases furent effectuées en cultures liquides stationnaires en flacons Erlenmeyer de 125 mL (Kirk et al., 1978). Cependant, l'utilisation d'un tel système n'est limité qu'à de petits volumes de cultures (10 mL) dans ces Erlenmeyers de 125 mL, et l'augmentation de l'échelle de production avec cette procédure s'est avérée sans succès. Aussi, il a été observé que la forme du flacon et du volume de culture peuvent affecter la production de ligninases, et qu'une augmentation proportionnelle du volume de culture et du volume du flacon ne permettent pas d'augmentation d'activité ligninase (diminution d'activité/mL de culture). Par contre, seulement une augmentation du rapport surface/volume de culture, et un volume limité de culture ont permis d'augmenter la production de ligninases en cultures stationnaires (Kirk et al., 1986 a,b).

Cela explique pourquoi diverses souches (mutants) de *P. chrysosporium* et divers systèmes de fermentation ont été comparés afin d'accroître l'activité ligninase (Kirk et al., 1986 a,b; Faison et Kirk, 1985; Paszczynski et al., 1986).

Les premières études de production de ligninases en cultures liquides en flacons agités ont permis d'observer la formation de croissance sous forme de pelotes mycéliales et la suppression complète de production de ligninases et de biodégradation de lignine (Faison et Kirk, 1985; Kirk et al., 1978). Schimada et al. (1981) ont postulé que la formation de pelotes mycéliales causée par l'agitation doit avoir des effets physiologiques délétères sur *P. chrysosporium* et peut aussi affecter le métabolisme secondaire en général. Cependant, l'effet délétère de l'agitation n'a pas encore été expliqué de façon satisfaisante. Même si la croissance fongique a lieu habituellement en cultures agitées, et que la cellulose peut être dégradée, peu ou aucun changement n'a lieu sur la lignine. L'incapacité de *P. chrysosporium* à dégrader la lignine en milieu agité fut associé aux faibles niveaux d'oxygène dissous dans les agrégats mycéliaux ou les pelotes de grandes tailles (Kirk et al., 1978), ainsi qu'aux interférences avec les réactions nécessitant la présence d'oxygène (Yang et al., 1980). Cela expliquerait pourquoi le taux d'oxydation du glucose est 10 fois plus rapide en conditions stationnaires (Ulmer et al., 1983). Aussi, l'agitation empêche la formation de peroxyde d'hydrogène, rendant impossible la ligninolyse (Forney et al., 1982). Cependant, la faible concentration d'oxygène à l'intérieur des pelotes mycéliales n'est probablement pas la raison principale expliquant l'absence de ligninolyse en milieu agité, puisque en bioréacteurs à agitation, aucun agrégat mycéliel n'est formé, et là encore, la lignine n'est pas dégradée. Mais aussitôt que ces cellules mycéliales sont transférées dans des conditions stationnaires, un voile mycéliel est formé, ayant

l'allure d'excroissances d'aggrégats ou de fragments mycéliaux, et seulement lorsque le voile mycéliel est formé, alors la ligninolyse, le taux d'oxydation du glucose, et la production de peroxyde d'hydrogène ont lieu (résultats non-publiés). Plus tard, certains succès furent obtenus avec les cultures en flacons agités par l'utilisation de détergents (Jäger et al., 1985; Leisola et al., 1985; Reid et al., 1985). Lorsque l'agitation fut alors utilisée (50 r.p.m.), une augmentation de l'activité ligninase était observée. Cependant, des vitesses d'agitation supérieures à 50 r.p.m. ont diminué l'activité ligninase (LiP)(Asther et al., 1987).

7.9. Effet des détergents ou surfactants.

Il a été démontré que la production de ligninases en cultures liquides agitées contenant une croissance sous forme de pelotes mycéliales est seulement possible que si un détergent est ajouté dans le milieu (Jäger et al., 1985; Faison et Kirk, 1985). Les premiers détergents étudiés étaient le Tween 20, Tween 80, et le 3-[(3-cholamidopropyl) diméthylammonio]-1-propanesulfonate (i.e. CHAPS) (Jäger et al., 1985). Les détergents suivants et leur concentration respective ont permis une production optimale de ligninases: 0,05% (v/v) pour Tween 80 et Tween 20. Aussi, l'acide oléique (0,08%), un acide gras, s'est avéré avoir un effet positif sur la production de ligninases (Asther et al., 1987; Jäger et al., 1985).

Les premiers résultats obtenus avec de tels additifs ont permis d'obtenir des activités ligninases comparables ou supérieures à toutes celles obtenues précédemment en cultures stationnaires, avec l'avantage d'utiliser un plus grand volume de culture, et aussi la possibilité d'augmentation de l'échelle de production en fermenteur à agitation conventionnel (STR). D'autres avantages de l'utilisation d'un système de culture liquide avec agitation plutôt que stationnaire sont une meilleure reproductibilité des activités et un meilleur contrôle des conditions: pH, tension d'oxygène (Reid et al., 1985).

Jansheker et Fiechter (1988) ont rapporté que les surfactants tels le polypropylène-glycol et le polyéthylène-glycol (10^3 ppm) ont permis des productions d'activités ligninases supérieures à celles obtenues avec les Tweens et aussi une consommation plus rapide et plus complète du glucose. Il est connu que le polyéthylène-glycol est utilisé comme agent de fusion des membranes (Sowers, 1987), et agit comme surfactant en augmentant la lipophilie sur la surface de la cellule (Kappeli, 1976). Cependant, la nature de l'effet des détergents n'est pas encore claire (Asther et al., 1987; Jäger et al., 1985). Il est au moins reconnu que ces agents peuvent augmenter la fluidité et la solubilité des membranes cellulaires, favorisant de ce fait la sécrétion des protéines extracellulaires (dont les ligninases), ainsi que le transfert de l'oxygène dissous à l'intérieur des cellules, permettant d'activer la production de ligninases et le métabolisme oxydatif. Ces effets peuvent être particulièrement importants dans le cas de pelotes ou d'aggrégats de grandes dimensions, où les échanges avec le milieu sont difficiles. Cependant, une étude récente sur l'effet de l'agitation

sur la production de ligninases a révélé que les détergents (Tweens et CHAPS) ont un rôle protecteur contre l'inactivation mécanique des ligninases par l'agitation (Venkatadri et Irvine, 1990). D'autres études sont envisagées afin d'élucider la nature de l'effet stimulateur de ces composés sur la production de ligninases.

7.10. Effet des lipides sur la production de ligninases.

La suppression de la production de ligninases en cultures agitées de *P. chrysosporium* empêche la production de ces enzymes à grande échelle (Faison et Kirk, 1985). La supplémentation des milieux de culture avec le Tween 80 a favorisé les rendements de ligninases en cultures agitées avec agitation réduite (50 r.p.m.) (Jäger et al., 1985). Le mécanisme par lequel le Tween 80 favorise l'activité ligninase fut étudié aussi bien que l'effet de la supplémentation de lipides et d'acides gras dans le milieu de culture (Asther et al., 1988 a,b).

Aussi, une souche mutante performante de *P. chrysosporium* pour la production de ligninases a été isolée par Buswell et al. (1984) et étudiée par Asther et al. (1988 a,b). Dans cette souche, nommée INA-12, la ligninase (LiP) est produite sous des conditions non-limitantes en carbone et en azote. Les rendements en ligninase obtenus par cette souche améliorée sont cependant encore largement insuffisants pour une production à grande échelle. L'amélioration de la production de ligninases par *P. chrysosporium* peut être approchée

par la sélection de souches mutantes mais aussi par des études de l'effet des composantes du milieu de culture sur leur production. Asther et al. (1988 a,b) a fait une étude sur l'effet de divers additifs du milieu (dont l'effet des lipides) sur la production de ligninases avec *P. chrysosporium* INA-12.

L'effet des acides gras insaturés ou huiles végétales, tels que l'huile de tournesol, et l'huile d'olive sur la production de ligninases avec *P. chrysosporium* INA-12 a été examiné en milieu contenant le glycérol comme source de carbone et l'alcool vératrylique comme inducteur (Asther et al., 1987). La supplémentation du milieu avec ces huiles a favorisé la production de ligninases (LiP) par rapport à des témoins sans huile ou acide gras. Les meilleurs résultats ont été obtenus après 4 jours d'incubation avec l'huile d'olive (21,3 nkat/mL = 1,278 U/mL), comparativement à (5,8 nkat/mL = 0,348 U/mL) pour le témoin sans lipide (nkat = nanokatal). Le mycélium cultivé en présence d'huile d'olive contenait une plus grande quantité de lipides totaux (7,7% vs. 3,3% pour le témoin) et le degré moyen d'insaturation (Δ /mole) a diminué de 1,4 (témoin sans lipide) à 1,3 (avec huile d'olive).

Les mécanismes par lesquels les composés lipidiques utilisés comme suppléments de culture favorisent l'activité ligninase ne sont pas encore clairs. Le mycélium se développant en présence d'huiles contient probablement une plus grande proportion de lipides insaturés

au niveau des membranes. Cela peut modifier la perméabilité qui, à son tour, stimule la synthèse et la sécrétion protéique.

D'autres résultats (Asther et al., 1988 b) ont révélé que la supplémentation de Tween 80 (0,05%) en cultures stationnaires de *P. chrysosporium* INA-12 développées en milieu contenant du glycérol comme source de carbone a permis d'augmenter de deux fois l'activité ligninase (LiP) (11,4 nkat/mL = 0,684 U/mL) vs. les témoins non-supplémentés (5,5 nkat/mL = 0,330 U/mL). Lorsque le Tween 80 était remplacé par l'acide oléique (0,035%), une augmentation de 4,1x était observée (22,3 nkat/mL = 1,338 U/mL). Aucune stimulation de synthèse protéique intracellulaire totale ne fut observée avec l'acide oléique. Aussi, le temps d'incubation requis pour atteindre l'activité ligninase maximale fut réduit de 6 à 4 jours. L'acide oléique peut être remplacée par des huiles végétales insaturées telles que l'huile de tournesol ou d'olive avec des résultats comparables. L'huile de tournesol contient principalement de l'acide linoléique (diinsaturé, C18:2), Alors que l'acide oléique (monoinsaturé C18:1) est le composant majeur de l'huile d'olive.

La supplémentation du milieu de croissance avec des huiles végétales émulsifiées (0,035%) avec Tween 80 (0,12%) ont favorisé l'activité ligninase autant que les huiles non-émulsifiées. La supplémentation avec des huiles riches en acide oléique (huile d'olive) ont permis d'obtenir des activités ligninases supérieures qu'avec les autres huiles. Des mixtures de phospholipides se sont avérées de bons

suppléments pour favoriser l'activité ligninase. Dans les milieux contenant de la lécithine ou de l'azolectine, l'activité ligninase a atteint 23,3 et 27,9 nkat/mL respectivement. Le couplage d'une source de triglycéride telle que l'huile d'olive avec un mélange de phospholipides (azolectine) ont davantage favorisé l'activité ligninase (~32 nkat/mL). La meilleure activité ligninase (LiP) obtenue dans toute cette étude (39 nkat/mL) fut obtenue en utilisant des mixtures de triglycérides et de phospholipides avec l'extrait de levure (concentration optimale= 1 g/L) à une température optimale de 31°C.

Cette étude a démontré que la production de ligninases avec *P. chrysosporium* INA-12 est favorisée de façon significative par la supplémentation d'acides gras mono-insaturés, triglycérides, et de phospholipides. Ces observations sont associées à des modifications dans la composition lipidique de la membrane mycéliale du fungus, favorisant directement la fluidité de la membrane. Il est aussi établi que la sécrétion des protéines ainsi que le transport de substances de faible poids moléculaire, l'activité des enzymes membranaires, et d'autres processus sont favorisés par l'augmentation de la fluidité membranaire, laquelle est à son tour dépendante de la nature des phospholipides, de leur composition en acides gras, aussi bien que de la température (Cherry, 1976).

Actuellement, aucun résultat n'est rapporté sur les effets des huiles et autres lipides sur la production de ligninases avec la souche naturelle de *P. chrysosporium* (ATCC-24725). Même si cette souche

semble être génétiquement moins performante pour la production de ligninases, elle a l'avantage de produire au moins 10 isoenzymes différentes de ligninases, dont certaines sont des peroxydases manganèse-dépendantes, qui ont été démontrées comme étant essentielles dans la dépolymérisation de la lignine. Cependant, la souche INA-12 peut produire seulement un nombre restreint d'isoenzymes de type LiP (jusqu'à 4). Donc, cette souche serait probablement moins efficace dans la biodégradation de la lignine.

Dans une étude intéressante (Schiesser et al., 1989), *Pleurotus ostreatus floridae* a été cultivé en culture liquide (milieu synthétique) avec l'addition de paille de blé comme source principale de carbone. L'effet de l'addition de petites quantités de sources de carbone (glucose, extrait de levure, huile de tournesol) sur la croissance mycéliale, le rendement de biomasse, et les activités enzymatiques ont été rapportés. Il est dit que l'huile, lorsque ajoutée au début de la fermentation, augmente le rendement de biomasse, mais diminue les activités cellulases en agissant dans le microenvironnement entre la surface de la cellulose et le site actif des enzymes. Cependant, il y a augmentation de l'activité laccase et de la ligninolyse. Mais, aucune activité ligninase n'a été détectée dans ces conditions.

7.11. Effet de la taille et de la concentration des pelotes mycéliales sur la production de ligninases (en cultures liquides agitées).

Certaines études en fermentation à agitation conventionnel (STR) utilisant le milieu carbone-limitant ont démontré que la formation de pelotes mycéliales est cruciale pour la production de ligninases (Janshekar et Fiechter, 1988). Dans toutes ces expériences en fermenteur où le fungus s'est développé, soit en populations mycéliales (aggrégats) ou en flocons mycéliaux, aucune production de ligninase n'a eu lieu. Cependant, la formation de pelotes mycéliales sphériques n'est pas la seule condition nécessaire pour la production de ligninases. Celles-ci doivent être d'un certain diamètre de grosseur: en fermenteur, des pelotes de petite taille (1-2 mm de diamètre) se comportaient comme des cultures mycéliales normales, et étaient malheureusement inactives pour la production de ligninases, alors que des pelotes de plus grande taille ont permis de détecter de l'activité ligninase. Mais, dû à des limitations de transfert de masse (limitations de diffusion des nutriments et de l'oxygène), ils ont produit une croissance plus lente et un taux plus bas de consommation du glucose. Cela implique une période d'incubation plus longue pour atteindre l'épuisement en substrat et le début de la phase métabolique secondaire de production de ligninases. C'est pourquoi des études d'optimisation, impliquant l'étude de l'effet de la taille et de la concentration des aggrégats mycéliaux ont été rapportées en

fermenteur de 42 litres (STR), en milieu carbone-limitant par Janshekar et Fiechter (1988).

En contrôlant la quantité d'inoculum de spores, il était possible de contrôler la taille et le nombre de pelotes par unité de volume de culture (concentration). Par exemple, lorsque le nombre de spores (concentration de spores de l'inoculum) était augmenté, alors le nombre de pelotes fut aussi augmenté, et dû à la concentration plus élevée de biomasse mycéliale produite, les taux de croissance et de consommation du glucose étaient aussi augmentés, mais la taille des pelotes fut alors inversement diminuée, et finalement, il n'y avait aucune activité ligninase détectable dans ces conditions. Les effets inverses (cas d'un nombre de spores diminué) étaient aussi vrais, mais dans ces derniers cas, la production de ligninases a eu lieu. Cependant, ces observations sont seulement valables que dans une certaine limite de concentrations de spores et de volumes de culture ($<$ ou $=$ 42 L). Donc, en général, un inoculum riche ($>4,8 \times 10^7$ spores/L culture) permet la formation de pelotes de petites tailles et aucune production de ligninases, alors qu'un inoculum moins abondant ($< 7 \times 10^6$ spores/L culture) augmente la taille des pelotes et prolonge la durée de développement de la culture (croissance plus lente), suivi par une phase active de métabolisme secondaire pour la production de ligninases (Janshekar et Fiechter, 1985).

Des études ultérieures en milieu azote-limitant en conditions agitées (50 mL de culture/ flacon de 250 mL) ont permis d'observer

deux effets simultanés: l'effet du nombre (concentration) et de la taille des pelotes sur la production de ligninases (Leisola et al., 1985). Ces études ont rapporté une production d'activité maximale de ligninases (LiP) de 0,118 U/mL lorsque le diamètre moyen des pelotes était de 1-2 mm, obtenu à partir d'un inoculum de 1×10^6 spores/L milieu, alors qu'à des tailles supérieures ou inférieures de pelotes, seulement 0,060 U/mL d'activité ligninase fut produite. Aussi, l'activité ligninase était directement proportionnelle aux concentrations de pelotes dans des concentrations variant entre 1,4 et 3,5 g pelotes/L de culture. Cependant, aucun de ces effets fut vraiment observé en conditions carbone-limitantes.

7.12. Comparaison de l'effet de la limitation en carbone ou d'azote en flacons agités.

Diverses stratégies ont été utilisées pour produire des niveaux plus élevés de ligninases en cultures liquides agitées (Leisola et al., 1985). Les premiers milieux agités utilisés étaient azote-limitants (Kirk et al., 1978), et les niveaux d'activité LiP obtenus étaient comparables à ceux rapportés en cultures stationnaires peu profondes (Tien et Kirk, 1983). Cependant, Jeffries et al. (1981) fut le premier à démontrer la biodégradation de la lignine en cultures carbone-limitantes, basant leur travail sur le fait que dans la nature, lorsque le fungus se développe sur le bois, il ne vit pas seulement dans des conditions azote-limitantes, mais aussi carbone-limitantes, après que les couches superficielles de polysaccharides sont consommées et que

la couche protectrice de lignine doit être dégradée par la production de ligninases afin d'atteindre la couche voisine de polysaccharides.

Plus tard, Faison et Kirk (1985), et Leisola et al. (1985) ont comparé la production de ligninases en milieu Kirk (Kirk et al., 1978; Fenn et Kirk, 1979) limitant en carbone ou azote, et supplémenté avec l'alcool vératrylique à la fin de la phase de croissance à une concentration optimale de 1,5 mM et aéré avec 100% d'oxygène, afin d'atteindre des activités ligninases élevées. Dans le milieu carbone-limitant, la concentration de glucose utilisée (source de carbone) était de 2 g/L et celle de diammonium tartrate (source d'azote) était de 0,66 g/L (7,2 mM). Dans le milieu azote-limitant, la concentration de glucose était de 10 g/L et celle de diammonium tartrate était de 0,20 g/L (1,7 mM).

Dans l'étude de Leisola et al. (1985), l'activité ligninase maximale (LiP) de 0,670 U/mL (1U= 1 nmole substrat/minute) était obtenue en milieu carbone-limitant, après 60 heures d'incubation. L'activité totale maximale par flacon et l'activité spécifique maximale étaient respectivement de 33600 U (50 mL/flacon) et 36 U/ μ g protéines. Ces résultats furent obtenus à une concentration mycéliale finale de 4 g/L, et les pelotes furent agglomérées en un agrégat mycéliel puisque la vitesse d'agitation n'était que de 60 r.p.m.

En conditions azote-limitantes, l'activité ligninase maximale de 0,118 U/mL était obtenue après 100 heures d'incubation, avec une activité spécifique maximale de 11,9 U/ μ g protéines, et une activité

totale maximale par flacon de 5900 U (50 mL/flacon). Ces résultats furent obtenus à partir d'un inoculum de 10^6 spores/L culture, qui s'est développé en pelotes de 1-2 mm de diamètre à une concentration finale de 2,8 g/L de biomasse mycéliale. Donc, ces résultats suggèrent que la limitation en carbone est plus efficace pour la production de ligninases, à cause des activités supérieures obtenues en ligninases, et l'apparition plus rapide de l'activité ligninase.

7.13. Effet du système de culture sur la production de ligninases (conception du bioréacteur).

Divers systèmes de culture ont été utilisés et comparés pour la production de ligninases avec *P. chrysosporium* (Janshekar et Fiechter, 1988). Les premières cultures utilisées pour la production de ligninases étaient des cultures stationnaires peu profondes en flacons Erlenmeyer de 125 mL (Faison et Kirk, 1985; Jäger et al., 1985; Janshekar et al., 1982; Leisola et al., 1985; Reid et al., 1985; Tran et Chambers, 1987). Ces cultures ont permis de produire des ligninases facilement, mais les activités obtenues étaient très faibles et la production à grande échelle (à grande surface) était sans succès, dû à des problèmes de limitation de volume de culture. La morphologie obtenue dans de telles conditions était sous forme de voile mycéliel sur la surface du milieu. Pendant ce temps, d'autres études furent orientées vers la production de ligninases en flacons agités (Asther et al., 1985; Faison et Kirk, 1985; Jäger et al., 1985; Leisola et Fiechter, 1985 a; Reid et al., 1985; Tran et Chambers, 1987). Les premières

tentatives de production furent sans succès, puisque l'agitation des cultures résultait en une formation de pelotes mycéliales qui supprimait toute activité ligninolytique (Kirk et al., 1978). Il a aussi postulé que la formation de pelotes par agitation pouvait affecter le métabolisme secondaire en général (Schimada et al., 1981). Plus tard, Faison et Kirk (1985) ont démontré que l'activité ligninase n'est possible en conditions liquides agitées que si un détergent est ajouté dans le milieu de culture (Jäger et al., 1985). Asther et al. (1987) ont aussi démontré que les détergents favorisent la production de ligninases en flacons agités, mais seulement à faible agitation (< 50 r.p.m.) pour éviter une diminution de la production. Par la suite, vinrent diverses méthodes pour la production de ligninases, soit en flacons ou en réacteurs, tels les disques rotatifs, utilisant une souche mutante de *P. chrysosporium* pouvant adhérer à des surfaces plastiques (Kirk et al., 1986 a), ou encore en flacons agités avec mycélium immobilisé dans des billes d'agarose ou d'agar, ou aussi dans des cubes en polyuréthane (Kirkpatrick et Palmer, 1987), afin de contrôler la taille des pelotes mycéliales. D'autres de ces méthodes utilisent l'immobilisation de voiles mycéliaux sur un support en fibres de nylon (Linko et al., 1987), ou en tubes de silicone (Willershausen et al., 1987). Les premières tentatives de production à grande échelle de ligninases en fermenteurs à agitation conventionnels (STR) ou en cultures stationnaires en larges flacons ou sur plateaux se sont avérées sans succès (Kirk et al., 1986 a). C'est pourquoi des études sur les caractéristiques physiologiques et de cultures pouvant affecter la croissance et la production de ligninases en fermenteur de 42-L (STR)

ont été effectuées par Jansheker et Fiechter (1988). Ces derniers ont démontré que certains facteurs sont effectivement responsables de la production de ligninases dans de tels systèmes à grande échelle: la présence et la nature des surfactants, le contrôle de la taille et de la concentration optimale des pelotes mycéliales, la présence de vitamines, et l'effet des éléments de trace. Les meilleures activités obtenues dans cette étude étaient de 0,106 U/mL (LiP) en fermenteur de 42-L, en utilisant le polyéthylène-glycol (PEG 2000) (10^3 ppm) avec un inoculum de 7×10^6 spores/L et une agitation de 150 r.p.m.

Plus récemment, une nouvelle conception de fermenteur utilisant des plaquettes de laine de nylon supportées par un châssis métallique sur lesquelles il y avait formation d'un biofilm mycéliel a permis de produire pour la première fois des quantités énormes de ligninases, à l'échelle-pilote, en fermenteur de 800 litres en mode fed-batch (Polvinen et al., 1991). Ce système a permis de récolter un total de 1,5 millions d'unités d'activité LiP en un mois. Les principales conditions utilisées étaient les suivantes: milieu carbone-limitant, aération continue avec l'oxygène pur, agitation de 100-200 r.p.m., 37°C , et $\text{pH} = 4,5$. Dans ce système, le glucose et l'alcool vératrylique étaient ajoutés en fed-batch. L'activité ligninase maximale obtenue dans le milieu de culture était de 0,432 U/mL.

7.14. Conditions ligninolytiques pour la biodégradation en fermentation à l'état solide.

Il existe une revue récente (Reid, 1989), sur la fermentation à l'état solide (FÉS) avec *P. chrysosporium* et d'autres champignons à carie blanche pour la biodégradation de la biomasse lignocellulosique. Selon cette revue, il semble que les procédés de FÉS peuvent être potentiellement réalisables économiquement à grande échelle pour la bioconversion des résidus lignocellulosiques en moulées animales, pulpe, et sucres. Cette revue discute aussi des champignons ligninolytiques, leurs besoins nutritionnels et écophysologiques, la conception de fermenteurs pour la dégradation à grande échelle, et aussi des considérations économiques.

8. OBJECTIFS DE RECHERCHE

La plupart des études déjà rapportées sur l'optimisation de la production de ligninases avec *P. chrysosporium* ATCC-24725 ont été effectuées en milieux liquides synthétiques avec le glucose comme source principale de carbone. À notre connaissance, aucune étude systématique sur l'effet de divers paramètres de culture avec une matière lignocellulosique comme source principale de carbone et d'énergie n'a été publiée ultérieurement.

Dû à son abondance, sa disponibilité, et son coût minime, et aussi dû au fait que les lignocelluloses sont des substrats naturels des champignons, nous avons utilisé des copeaux de bois (bois de tremble) comme source principale de carbone et d'énergie en cultures liquides agitées ainsi qu'en fermentation à l'état solide.

C'est la première étude systématique sur l'effet de la plupart des paramètres déjà étudiés (conditions, ingrédients), et d'autres nouveaux paramètres, sur la production de ligninases avec un milieu à base de substrat lignocellulosique avec *P. chrysosporium*.

Avec les meilleures conditions établies, nous avons augmenté l'échelle de production en fermenteur conventionnel de 10 litres ainsi qu'en cuve de 4 litres, afin d'effectuer une évaluation préliminaire de la faisabilité du procédé à grande échelle.

L'établissement des conditions optimales de culture avec un milieu à base de copeaux de bois serait un bon point de départ pour la meilleure compréhension des besoins nutritionnels particuliers du champignon pour la croissance et le métabolisme secondaire avec un substrat lignocellulosique. Dans le futur, un tel procédé, si suffisamment efficace, permettrait simultanément de biodégrader divers substrats lignocellulosiques et de produire suffisamment de ligninases pour différentes études ou applications industrielles.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. MATÉRIELS

1.1. Micro-organisme.

Les cultures de *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 (BKM-F-1767), sont maintenues sur milieu malt agar 2% en pétris pour la production de spores. Des repiquages ont été effectués à tous les 6 mois. La croissance a lieu à 37°C, et l'entreposage à 4°C.

1.2. Substrats.

- Le glucose est utilisé comme substrat pour les inocula, et peut être ou non utilisé en fermentations (flacons et fermenteur).
- Les copeaux de bois (tremble), proviennent du moulin à scie de Laval-Des-Rapides, et est utilisé tel quel ou moulu en fermentations.
- Bois moulu de tailles variées: 20, 10, 5, et 2,5 mesh.
(20 mesh= 1 mm², 10 mesh= 2 mm², 10 mesh= 4 mm², et 2,5 mesh= 8 mm²).

1.3. Produits chimiques.

Tous les produits chimiques utilisés sont de qualité réactif.

1.4. Matériel de fermentation.

Pour les fermentations en flacons, le matériel utilisé est le suivant:

- Flacons Erlenmeyer de 250 mL.
- Incubateur agitateur (New Brunswick Scientific Co.).
- pH mètre (Corning 220, électrode Corning #476570).
- Boîtes en acier inoxydable à l'intérieur desquelles les milieux solides sont déposés sur une grille, pour la FÉS.

Les principales composantes des fermenteurs sont les suivantes:

- Fermenteur à cuve en acier inoxydable de 16 litres, muni d'un agitateur à turbines (trois turbines à quatre pales) et de quatre déflecteurs (Microgen, New Brunswick Scientific Co.).
- Electrode pour la mesure du pH (Ingold modèle 465).
- Sonde à oxygène dissout (New Brunswick, série 900).

- Fermenteur à cuve en verre (Pyrex) de 4 litres, muni d'une ouverture à la base pour les prélèvements.
- Le système d'aération est de fabrication artisanale, à partir d'un microdiffuseur sphérique.
- La cuve est installée à l'intérieur d'un incubateur à agitation rotative, ce qui permet le contrôle de la température et de l'agitation.
- Le pH est contrôlé indirectement à partir des ajustements sur prélèvements.

1.5. Appareils.

- Spectrophotomètre UV-visible (Unicam SP 1800)

- Etuve à 80°C pour les déterminations de poids secs.
- Balance analytique.
- Centrifugeuse (Beckman modèle J-21 B).
- Les manipulations aseptiques sont effectuées dans une hotte laminaire.
- Pour moudre les copeaux de bois à une taille de 20 mesh, on utilise un moulin Wiley (Arthur Thomas Co. Philadelphia, P.A. Modèle 5 x B600 BD).
- Pour obtenir des tailles de bois plus grosses que 20 mesh, on utilise des tamis de 10, 5 et 2,5 mesh (Tyler Co.).

2. MÉTHODES

2.1. PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES

2.1.1. Culture de *Phanerochaete chrysosporium* ATCC-24725.

Les spores sontensemencés et maintenus sur milieu malt agar 2% dans des pétris. Certaines cultures ont été maintenues sur milieu malt agar 2% (50 mL) en flacons Erlenmeyer de 250 mL. Ces dernières ont été très utiles pour obtenir des suspensions de spores pour inoculations. Après ensemencement, ces cultures sont incubées à 37°C pendant 2 semaines, ou jusqu'à ce que la surface de l'agar soit recouverte de spores et que le milieu passe de jaunâtre à transparent.

Les cultures sont alors entreposées à 4°C pendant 6 mois et les cultures inutilisées sont repiquées sur milieux frais.

2.1.2. Pureté des cultures.

La pureté de toutes les cultures (spores, inocula et milieux de fermentation) est vérifiée par repiquage sur milieu PDA (Potato dextrose agar), de même que par observation au microscope, afin de s'assurer de l'absence de contamination.

2.1.3. Stérilisation:

Les milieux de cultures (en flacons) sont stérilisés à 121°C pendant 30 minutes. Le milieu de culture en fermenteur en cuve de 4 L est stérilisé 2 fois à 1 jour d'intervalle à 121°C pendant 30 minutes. Les repiquages et transferts de cultures, de même que les ajustements de pH sont effectués dans des conditions aseptiques.

2.1.4. Préparation de l'inoculum.

2.1.4.1. Ensemencement de l'inoculum.

Pour l'ensemencement des inocula, 20 mL d'eau distillée pré-stérilisée sont ajoutés par flacon de culture de maintenance contenant des spores. Le tout est agité jusqu'à suspension homogène des spores.

Puis, chaque milieu inoculum est ensemencé avec 4 mL de cette suspension.

2.1.4.2. Milieu inoculum.

Le milieu inoculum est un milieu Mandels (1965) que nous avons modifié: il est enrichi 2.5X en source de carbone (glucose), et 1.5X en sources d'azote et de phosphate, supplémenté en extrait de levure, et les éléments de traces utilisés proviennent d'une solution d'éléments de traces de Kirk (Tien et Kirk, 1988), afin de produire une suspension riche en mycélium.

La composition du milieu inoculum est la suivante: (dans 1 litre)

Glucose	25 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,1 g
KH ₂ PO ₄	3,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3 g
CaCl ₂	0,3 g
Extrait de levure	3,0 g
Solution éléments traces*	70 mL
Tampon Na-tartrate	5,752 g (25 mM)
pH 5,0	

* Solution d'éléments de traces de Kirk (Tien and Kirk, 1988):
(dans 1 litre)

MgSO ₄ .7H ₂ O	3 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,5 g
NaCl	1,0 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,183 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g
CuSO ₄	0,1 g
AlK(SO ₄) ₂ .12H ₂ O	10 mg
H ₃ BO ₃	10 mg
Na ₂ Mo ₄ .2H ₂ O	10 mg
Nitriлотriacétate	1,5 g
pH	6,5

Conditions de culture:

pH	5,0
Température	39°C
Agitation	175 r.p.m.
Aération	Air (bouchon en mousse)
Réceptient	Flacon Erlen. de 250 mL
Volume de culture	100 mL/Erlenmeyer
Temps d'incubation	72 h

Lorsque le temps d'incubation de l'inoculum est terminé, on devrait obtenir une production mycéliale abondante sous forme de balles "pelotes" blanches, et le milieu devrait être clair, sinon, il y a forte possibilité de contamination.

2.1.4.3. Lavage et broyage mycéliel de l'inoculum.

Ensuite, les cultures d'inoculum sont transférées dans des bouteilles à centrifugation de 150 mL, et balancées. Les bouteilles sont alors centrifugées à 7000 r.p.m. pendant 30 minutes à 20 °C. Le culot mycéliel ainsi formé est conservé et le surnageant est éliminé soigneusement. Le culot est resuspendu dans son volume initial avec du milieu de fermentation (dépendamment de l'expérience: milieu standard ou carbone limitant, sans copeaux de bois). Le tout est transféré dans une cuve à malaxeur et broyé pendant 30 secondes. L'inoculum est alors prêt pour l'ensemencement du ou des milieux de fermentation.

2.1.5. Fermentation à l'état liquide (FÉL) (fermentation submergée) et fermentation à l'état solide (FÉS).

2.1.5.1. Ensemencement des milieux de fermentation.

Pour les milieux liquides, la proportion standard d'inoculum est de 10% (v/v) (5 mL d'inoculum/50 mL de culture). Pour les milieux solides, elle est de 10 mL d'inoculum /20 g de copeaux de bois dans une boîte.

À la fin de l'ensemencement, il est important de conserver assez d'inoculum pour vérifier s'il n'y a pas eu de contamination (sur milieu

"Potato Dextrose Agar"), et aussi pour la détermination du poids sec de l'inoculum.

2.1.5.2. Composition des milieux de fermentation pour la production de ligninases.

Les milieux de fermentation pour la production de ligninases sont à base de copeaux de bois de tremble. La composition du milieu standard (std.) pour la fermentation à l'état liquide (FÉL) fut établie à partir du milieu limité en azote de Kirk (Tien and Kirk, 1988), et de Jeffries (Perez et Jeffries, 1990) et la composition du milieu limité en carbone (FÉL) est basée sur le milieu limité en carbone de Kirk (Kirk et al., 1978) et le milieu standard. Dans l'étude d'optimisation, tous les paramètres de cultures présentés ici demeurent inchangés, sauf le(s) paramètre(s) étudié(s), tels qu'indiqués. En cultures liquides, chacune des expériences impliquant un paramètre étudié est effectuée en triplicata. En fermentation à l'état solide, chaque expérience a été effectuée en duplicata. Voir les compositions des milieux et conditions de fermentation en pages suivantes.

2.1.5.2.1. COMPOSITION DES MILIEUX KIRK ET JEFFRIES POUR LA PRODUCTION DE LIGNINASES EN CULTURES LIQUIDES AGITÉES:

	Milieu Kirk* (N-limitant)	Milieu Jeffries**
Glucose	10 g/L	10 g/L
(NH ₄) ₂ Tartrate	0,20 g/L	0,20 g/L
KH ₂ PO ₄	2 g/L	2 g/L
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,5 g/L	0,5 g/L
CaCl ₂	0,1 g/L	0,1 g/L
Thiamine-HCl	1 mg	1 mg
Tampon 2,2 DMS***	10 mM	---
Tampon Na-Tartrate	---	20 mM
Alcool vératrylique	0,4 mM	---
Tween 80	0,05%	---
Tween 20	---	0,05%
Soln. élém. trace*/**	60 mL	70 mL (sans MnSO ₄ .H ₂ O)
MnSO ₄ . H ₂ O ([Mn ²⁺])	11,15 ppm	0,3 ppm=[bas] 11,15 ppm=[normal] 40 ppm = [élevée] Ajouté après 48 h de croissance.

Conditions:	Kirk (N-limitant)*	Jeffries**
pH	4,5	4,5
Température (°C)	39	39
Agitation (r.p.m.) ⁽¹⁾	200 (Erlen. 125 mL) 125 (Erlen. 2-L)	180(Erlen. 125 mL) 120 (Erlen. 2-L)
Aération ⁽²⁾	100% O ₂	100% O ₂
Vol.milieu/Flacon	45 mL/Erlen.125 mL 750 mL/Erlen. 2-L	40 mL/Erlen.125 mL 750 mL/Erlen. 2-L
Inoculum ⁽³⁾	10% (v/v)	10% (v/v)

(*/**) Composition de la solution d'éléments de traces de Kirk
(par litre):

MgSO ₄ .7H ₂ O	3 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,5 g
NaCl	1,0 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,183 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g
CuSO ₄	0,1 g
AlK(SO ₄) ₂ .12H ₂ O	10 mg
H ₃ BO ₃	10 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	10 mg
Nitriiotriacétate (N(CH ₂ CO ₂ Na) ₃ .H ₂ O)	1,5 g
pH	6,5

(1) Sur agitateur rotatif (2,5 cm de diamètre/cycle de rotation).

(2) Milieu Kirk: purgé avec O₂ pur lors de l'inoculation et les jours suivants.

Milieu Jeffries: purgé avec O₂ pur, 48 heures après inoculation, et jours suivants.

Temps d'aération: 1 minute, débit: 6,5 L/minute (Erlen. 125 mL),
10,5 L/minute (Erlen. 2-L).

(3) Milieu Kirk: Inoculum mycéliel (broyat) produit en culture stationnaire de 50 ml en flacon Fernbach (2,8-L) en milieu Kirk sans Tween 80, à partir de spores. Après 48 h de croissance à 39°C, le milieu est broyé 1 minute (45 mg de poids sec).

Milieu Jeffries: Inoculum de spores. Concentration finale:
(5,5x10⁴ spores/mL milieu).

* Ref.: Milieux Kirk: (N-limitant): Kirk et al. (1988).

** Ref.: Perez et Jeffries (1990)

*** 2,2 DMS= 2,2 Diméthyl succinate.

**2.1.5.2.2. COMPOSITION DES MILIEUX DE FERMENTATION
ÉTABLIS DANS CETTE ÉTUDE POUR LA PRODUCTION
DE LIGNINASES:**

	(FÉL) MILIEU STANDARD (Dans 1 litre)	(FÉL) MILIEU C-LIMITANT (Dans 1 litre)	(FÉS) MILIEU STANDARD (Boîtes en acier inoxydable)
Copeaux de bois	20 g	20 g	Dim.: 6"x 6"x 3" haut
Glucose	5 g	---	Volume boîte: 1,77 L
KH ₂ PO ₄	2 g	2 g	Volume de la
MgSO ₄ .6H ₂ O	0,5 g	0,5 g	fermentation: 0,88 L
CaCl ₂	0,1 g	0,1 g	
(NH ₄) ₂ tartrate	0,2 g	0,66 g	Compositioin du milieu
Extrait de levure	2 g	---	standard (std.):
Solution éléments trace*	70 mL	70 mL	90 mL milieu liquide
Alcool vératrylique	2,5 mM	2,5 g	standard + 20 g
Thiamine-HCl	---	1 mg	copeaux de bois.
Na-Tartrate (tampon)	25 mM	25 mM	
Polyéthylène-glycol 6000	2,5 g	2,5 g	
Huile de canola (Crisco)	---	3,5 g	
MnSO ₄ .H ₂ O ([Mn ²⁺])	11,1 ppm	11,1 ppm	

CONDITIONS:

pH	4,5	4,5	pH	4,5
Température	39°C	30°C	Température	30°C
Agitation (r.p.m.) ⁽¹⁾	175	175	% Humidité	33%
Aération ⁽²⁾	100%O ₂	air	Atmosphère	air
Volume de culture ⁽³⁾	50 mL	50 mL		
Mode fermentation	batch	batch		
Récipient	Erlen. de 250 mL			

* Solution d'éléments de traces de Kirk (Tien and Kirk, 1988), sans
MnSO₄.H₂O (voir p. 74)

- (1) Agitation circulaire.
- (2) L'incubation avec 100% O₂ est effectuée comme suit: Des bouchons en caoutchouc sont installés après stérilisation. L'oxygène pur comprimé est injecté dans chaque flacon pendant 1 minute (10 p.s.i.) , après 2 jours d'incubation, et est régénéré à tous les 2 jours suivants, ou après chaque prélèvement. L'atmosphère d'air est obtenue automatiquement en utilisant les bouchons en polyuréthane.
- (3) Le volume de culture inclut le volume de milieu (45 mL) + le volume d'inoculum (5 mL).

2.1.6. Fermentation liquide de 10 litres en fermenteur à turbines conventionnel d'une capacité de 16 litres.

La température est maintenue automatiquement par le passage d'eau chaude ou froide dans l'enveloppe de la cuve et dans les contre-pales du fermenteur. L'agitation à turbines peut être ajustée manuellement selon l'évolution de la fermentation. Le pH est ajusté automatiquement par addition d'acide (H₂SO₄ 15%) ou de base (NaOH 15%).

L'aération par microdiffusion est ajustée manuellement selon la concentration d'oxygène dissout dans la milieu, soit entre 80 et 100% . La mousse formée est contrôlée manuellement par addition d'anti-mousse Emulsion A. Un échantillon de 50 mL est prélevé au temps zéro

et quotidiennement, jusqu'à la fin de la fermentation, et conservé à 4°C pour les essais enzymatiques.

Voici la composition du milieu et conditions utilisées en fermentation de 10 litres:

Composition du milieu: Identique à celle utilisée en flacons (FÉL, milieu C-limitant, [Mn]= 40 ppm), excepté que le tampon Na-tartrate n'est pas ajouté.

Conditions de fermentation:

pH	4,5
Température	37°C
Agitation	175 r.p.m.
Aération	100% O ₂ ou air comprimé (~5 p.s.i.). Débit: 0,5 à 1,0 vvm (volume de gaz/volume liquide/minute) Concentration d'oxygène dissout: 80 à 100%.
Volume de culture	10 L (inclut 9 L milieu + 1 L inoculum).
Mode fermentation	Batch.
Fermenteur	"Bench-top fermenter" d'une capacité maximale de 16 litres.

2.1.7. Fermentation liquide de 3 litres en mini-fermenteur artisanal (cuve en verre de 4 litres) (Fig. 5).

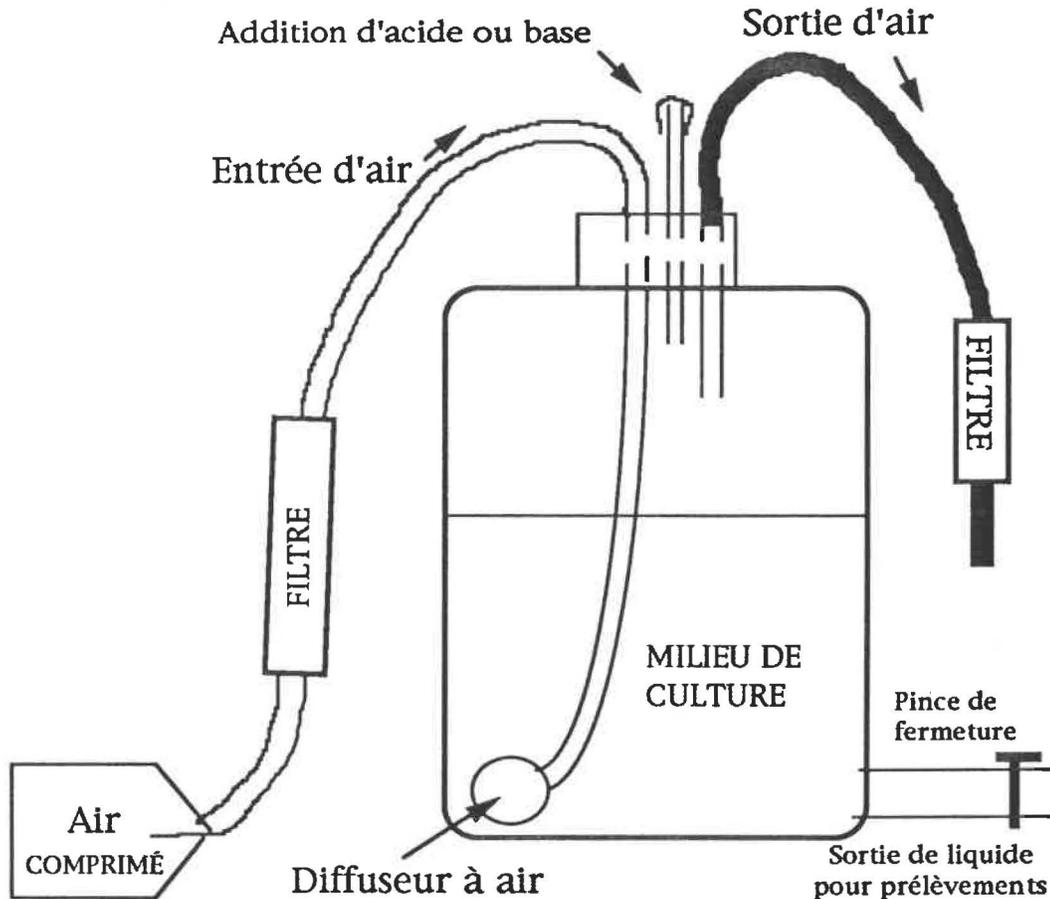
La température et l'agitation sont contrôlées automatiquement à l'intérieur de l'incubateur à agitation circulaire. Le pH est vérifié quotidiennement et ajusté manuellement avec un acide (H_2SO_4 6%) ou une base (NaOH 6%) à partir du prélèvement. L'aération par microdiffusion est ajustée à une pression de 10 p.s.i. La mousse est contrôlée manuellement par addition d'anti-mousse Emulsion A. Un échantillon de 50 mL est prélevé au temps zéro et quotidiennement, puis conservé à 4°C pour les essais enzymatiques. La composition du milieu et les conditions de fermentation sont les suivantes:

Composition du milieu: Milieu optimal obtenu en flacons. Il s'agit du milieu C-limité modifié (non tamponné de Na-tartrate, [Mn] = 40 ppm)

Conditions de fermentation:

pH	4,5
Température	30°C
Agitation	150 r.p.m.
Aération	air comprimé (25 p.s.i.)
Volume de culture	3 Litres (comprend 2,7 L milieu + 0,3 L inoculum)
Mode de fermentation	Batch
Fermenteur	Cuve de verre d'une capacité totale de 4 L. Le système de fermentation est fabriqué à la main, et illustré en figure 5.

Fig. 5: Schéma du mini-fermenteur artisanal en cuve de verre de 4 litres utilisé pour la production de ligninases.



Ce schéma illustre le système de fermentation utilisé pour l'étude de production de ligninases en fermentation de 3 litres. Le fermenteur est utilisé à l'intérieur d'un incubateur à agitation rotative.

CONDITIONS:

pH:	4,5 (Ajusté quotidiennement avec solution NaOH ou H ₂ SO ₄ 6%)
Température:	30°C
Aération:	Air comprimé (25 p.s.i.)
Agitation:	150 r.p.m.
Vol. total culture:	3 litres (Comprend 2,7 L de milieu + 0,3 L d'inoculum)

2.1.8. Récolte d'enzymes.

Cultures liquides: Les prélèvements sont effectués quotidiennement à raison de 4 mL de culture par jour. Pour le milieu standard, les prélèvements sont effectués du jour 5 au jour 10. Pour le milieu carbone limitant, ceux-ci sont effectués du jour 3 au jour 9.

Fermentation à l'état solide: Les prélèvements sont effectués 1 fois par semaine, du jour 21 au jour 42, s'il y a lieu, à raison de deux boîtes recueillies par expérience. Le contenu de chacune des boîtes est mélangé, puis pressé dans 2 épaisseurs de coton-fromage pour recueillir le maximum de l'extrait liquide. Le volume de ce liquide est mesuré pour déterminer ultérieurement l'activité totale par boîte.

Tous les échantillons sont centrifugés à 12000 r.p.m. pendant 10 minutes à 4°C. Les surnageants sont ensuite conservés à 4°C pour les essais enzymatiques.

2.2. PROCÉDURES ANALYTIQUES

2.2.1. Essais enzymatiques.

Dans les essais effectués, la température d'incubation des échantillons est la température de la pièce (25°C). Telle que calculée dans tous ces essais, l'unité d'activité équivaut à 1 micromole de

substrat oxydé par minute. Dans l'essai de l'oxydation de l'alcool vératrylique, l'échantillon d'enzyme peut avoir été dilué 1/2 lorsque nécessaire (à des niveaux supérieurs à 1 unité d'activité LiP), mais il faut en tenir-compte dans la calcul de l'activité. Ex.: Dilution 1/2 => Facteur de dilution = 2. Il faut donc multiplier la Δ D.O./min. par le facteur de dilution (Ref.: Mandels et al., 1976).

2.2.1.1. Activité Lignine peroxydase (LiP).

2.2.1.1.1. Méthode pour les cultures liquides (FÉL).

Oxydation de l'alcool vératrylique en vétraldéhyde ($\lambda=310$ nm)
(Ref.: Tien and Kirk, 1988; Kirk et al., 1990)
(Voir structure des composés en annexe)

Dans une cuvette en polyacrylate (3 mL):

0,25 mL Echantillon d'enzyme (Surnageant de culture)
+ 0,25 mL alcool vératrylique (10 mM)
+ 2,25 mL Tampon Na-tartrate, pH=3,0 (66,7 mM)
+ 0,25 mL H₂O₂ (0,1 mM)

Volume total dans la cuvette = 3,00 mL

Blanc = Contenu de la cuvette sans H₂O₂ et l'échantillon d'enzyme.

Dans cet essai, l'addition du peroxyde d'hydrogène initie la réaction. L'activité LiP est directement proportionnelle à l'augmentation d'absorbance/minute, et est exprimée en unités d'activité LiP par mL

de surnageant de culture. L'activité LiP est calculée en prenant la variation maximale d'absorbance à 310 nm/minute, comme suit:

$$[(\Delta \text{ D.O./min} \times 323) / 250] \times \text{facteur de dilution} =$$

$$(\# \text{ D'unités LiP/ mL de surnageant de culture}) \times \text{facteur de dilution.}$$

2.2.1.1.2. Méthode pour les cultures à l'état solide (FÉS).

Oxydation de l'ABTS ($\lambda = 420 \text{ nm}$) (Ref.: Archibald, 1992)
 ABTS= 2,2'-azinobis-(3-ethyl benzthiazoline-6-sulfonate(6)).
 (De: Boehringer) (Voir structure du composé en annexe)

Dans une cuvette en polyacrylate ou polystyrène (3 mL):

0,25 mL Échantillon d'enzyme (extrait liquide)
 + 0,25 mL ABTS (5 mM)
 + 2,25 mL Tampon Na-tartrate, pH=3,0 (66,7 mM)
 + 0,25 mL H₂O₂ (0,1 mM)

Volume total dans la cuvette= 3,00 mL

Blanc = Contenu de la cuvette sans H₂O₂ et l'échantillon d'enzyme.

Dans les échantillons d'enzymes en FÉS, la présence trop élevée de lignines et autres pigments solubles du bois interfère dans l'essai de l'alcool vératrylique (dans l'ultra-violet). C'est pourquoi, afin d'éliminer cette interférence, nous devons utiliser un essai dans le spectre visible (l'oxydation de l'ABTS), rapporté comme étant aussi adéquat pour la détection d'activité LiP. Cependant, en comparant les activités LiP

obtenues de la méthode ABTS et l'alcool vératrylique, nous avons observé que les valeurs obtenues avec l'ABTS sont 1,32x plus élevées avec des échantillons d'enzyme de la FÉL. Cependant, nous ne pouvons déterminer un facteur de corrélation entre les échantillons de FÉL et FÉS puisque nous ne connaissons pas l'effet des pigments dans les échantillons de la FÉS. C'est pourquoi le facteur théorique de 2 fut utilisé pour les calculs d'activité LiP en FÉS.

Dans cet essai, l'addition du peroxyde d'hydrogène initie la réaction. L'activité LiP est directement proportionnelle à l'augmentation d'absorbance à 420 nm/minute, et est exprimée en unités d'activité LiP par mL d'extrait liquide de culture. L'activité est calculée en prenant la variation maximale d'absorbance/minute, comme suit:

$$[(\Delta \text{ D.O./min}) / 2] = \# \text{D'unités d'activité LiP/ mL d'extrait liquide de culture.}$$

2.2.1.2. Activité peroxydase manganèse-dépendante.

Oxydation du Rouge de Phénol ($\lambda = 431 \text{ nm}$)

(Ref.: Archibald, 1990)

(Voir structure du Rouge de Phénol en annexe)

Dans une cuvette en polyacrylate ou polystyrène (3 mL):

0,25 mL Echantillon d'enzyme
+ 2,50 mL d'une solution contenant:
Rouge de Phénol (0,1 mM)
Tampon Na-malonate, pH 4,5 (50 mM)
MnSO₄.H₂O (0,1 mM)
Gélatine (3 g/L)
+ 0,25 mL H₂O₂ (50 μM)

Volume total dans la cuvette= 3,00 mL

Blanc = Contenu de la cuvette sans H₂O₂ et l'échantillon d'enzyme.

Dans cet essai, l'addition du peroxyde d'hydrogène initie la réaction. L'activité MnP est directement proportionnelle à la diminution d'absorbance/minute, et est exprimée en unités d'activité MnP par mL d'échantillon d'enzyme. L'activité est calculée en prenant la variation maximale d'absorbance à 431 nm/minute, comme suit:

$[(\Delta \text{ D.O./min}) / 0,05] = \# \text{D'unités d'activité MnP/ mL d'échantillon d'enzyme.}$

2.2.1.3. Activité Laccase.

Pour la détermination d'activité laccase, nous avons utilisé la méthode d'oxydation de l'ABTS.

Cependant, au cours de cette étude, nous avons comparé différentes méthodes à celle déjà utilisée, et nous avons observé que la méthode

utilisant le 2,6 Diméthoxyphénol (voir structure en annexe) est plus rapide d'utilisation, mais est moins spécifique à la présence de laccase (interférence de l'activité MnP).

2.2.1.3.1. Oxydation de l'ABTS ($\lambda = 420$ nm)
(Ref.: Archibald, 1992)

Dans une cuvette en polyacrylate ou polystyrène (3 mL):

0,25 mL Échantillon d'enzyme
+ 0,25 mL ABTS (5 mM)
+ 2,50 mL Tampon Na-acétate, pH=5,0 (0,1 M)

Volume total dans la cuvette= 3,00 mL

Blanc = Contenu de la cuvette sans l'échantillon d'enzyme.

Dans cet essai, l'addition de l'enzyme initie la réaction. L'activité Laccase est directement proportionnelle à la diminution d'absorbance/minute, et est exprimée en unités d'activité Laccase par mL d'échantillon d'enzyme. L'activité est calculée en prenant la variation maximale d'absorbance à 420 nm/minute, comme suit:

$[(\Delta \text{ D.O./ml}) / 2] = \# \text{ D'unités d'activité laccase/ mL d'échantillon d'enzyme.}$

2.2.2. Détermination des protéines.

Les échantillons prélevés lors de la fermentation liquide en fermenteur de 3 litres sont analysés par le test Lowry (Lowry et al., 1951; Paterson, 1979).

2.2.3. Détermination du poids sec de la biomasse mycéliale des inocula.

Un échantillon d'un certain poids d'inoculum mycéliel liquide (broyat ou pelotes) est pesé, puis étuvé à 80°C pendant 24 heures. L'échantillon est ensuite déposé 10 minutes dans un dessiccateur, puis pesé de nouveau pour mesurer le poids sec. Le rapport de poids sec résiduel d'échantillon sur le poids liquide est multiplié par 100 pour obtenir le pourcentage de poids sec de l'échantillon.

2.2.4. ÉVALUATION DE LA PRODUCTION DE LIGNINASES.

Dans cette étude, lorsque nous parlons d'activités ligninases, celles-ci sont toujours exprimées en concentrations individuelles pour chaque type de ligninase produite (i.e. unités d'activités LiP ou MnP produites par millilitre de milieu de culture). Dans chacune des expériences effectuées, le ou les paramètres optimaux sont établis selon les activités maximales obtenues pour chaque type de ligninase. Donc:

2.2.4.1. Calcul de l'activité ligninase.

Activité max. LiP = Unités LiP/mL = U/mL

Activité max. MnP = Unités MnP/mL = U/mL

(1 Unité = 1 unité internationale = 1 μ mole de substrat oxydé/minute)

2.2.4.2. Calcul de la productivité en ligninase.

Dans certaines expériences, nous avons évalué la performance de la production de ligninases selon les productivités individuelles de chaque type de ligninase (LiP et MnP) produite:

Productivité en LiP = $\frac{\text{Activité max. LiP}}{\text{Jours d'incubation}}$ = U/(mL . Jour)

Productivité en MnP = $\frac{\text{Activité max. MnP}}{\text{Jours d'incubation}}$ = U/(mL . Jour)

2.2.4.3. Calculs d'erreur:

L'erreur sur les résultats (exprimée en pourcentage) est exprimée d'après la déviation moyenne sur les résultats:

Exemple: Les expériences de FÉL sont effectuées en triplicata, et chaque valeur d'activité exprimée sur les graphiques est donc une moyenne de trois valeurs, donc le calcul suivant doit être effectué pour exprimer l'erreur sur les résultats (en %):

$$(V_1 + V_2 + V_3)/3 = V_{\text{moyen}}$$

$$(\Delta V_1 + \Delta V_2 + \Delta V_3)/3 = \Delta V_{\text{moyen}}$$

$$(\Delta V_{\text{moyen}}/V_{\text{moyen}}) \times 100 = \% \text{ d'erreur.}$$

où V_x représente une valeur d'un triplicata.

V_{moyen} représente la moyenne des valeurs du triplicata.

ΔV_{moyen} représente la déviation moyenne à la valeur moyenne.

$\Delta V_x = (V_x - V_{\text{moyen}})$ représente l'écart à la moyenne en valeur absolue (pour chaque valeur du triplicata).

Le % d'erreur sur les résultats de chaque expérience est indiqué sur chaque graphique ou tableau correspondant, et correspond à la moyenne des % d'erreurs obtenus pour toutes les valeurs obtenues de l'expérience correspondante.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. INTRODUCTION

Dans cette étude d'optimisation, nous avons comparé l'effet de divers paramètres sur la production de ligninases, afin de formuler un milieu optimal permettant de produire des niveaux maximaux d'activités ligninases.

Pour ce faire, dans chaque expérience un paramètre optimal fut déterminé selon le maximum d'activité individuelle des ligninases LiP et de MnP produites par millilitre de milieu. Dans les expériences où nous avons comparé diverses sources d'azote organique (FÉL, Fig. 21) et dans la détermination du milieu optimal (FÉL, Fig. 41), nous avons déterminé le ou les paramètres optimaux par le calcul de la productivité (maximum d'activité individuelle des ligninases LiP et MnP obtenues par millilitre par jour d'incubation). (Voir calculs dans les méthodes).

2. FERMENTATION À L'ÉTAT LIQUIDE:

2.1. Formulation d'un milieu standard pour l'étude de l'effet de divers paramètres sur la production de ligninases:

Au tout début de cette étude, nous avons utilisé le milieu limitant en azote de Kirk (Tein et Kirk, 1988) pour la production de

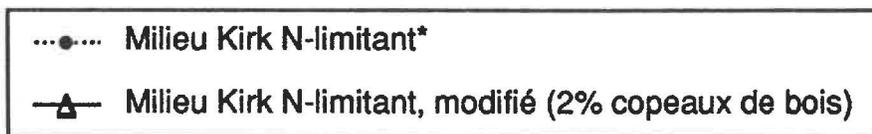
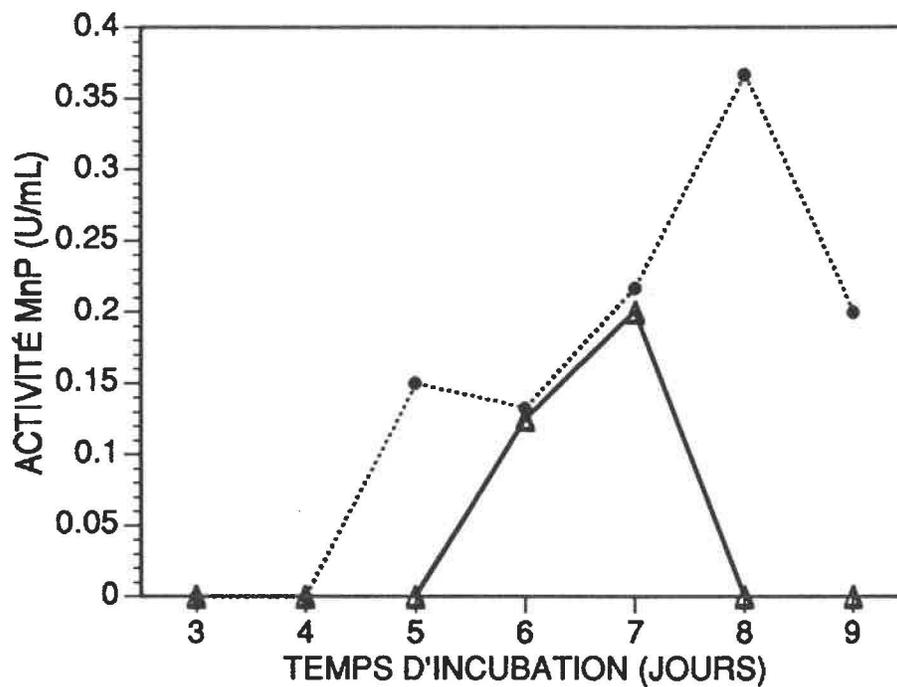
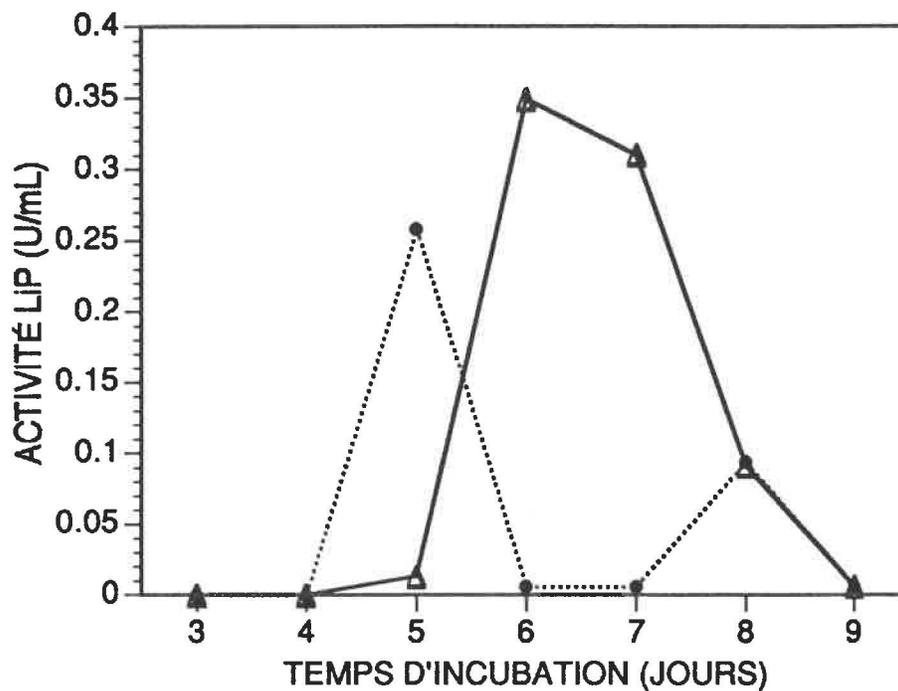
ligninases, mais la plupart du temps, aucune activité ligninase ne fut produite, et lorsque de l'activité fut produite, elle était très faible. C'est pourquoi nous avons jugé bon de le modifier en y ajoutant des copeaux de bois, supposant que ce substrat naturel de *P. chrysosporium* pourrait jouer un certain rôle sur la production de ligninases, puisque dans la nature, des ligninases sont produites par les champignons dégradeurs de bois pour permettre leur croissance sur un tel substrat.

Donc, dans une première expérience (Fig. 6), le milieu azote-limitant de Kirk fut utilisé dans une série de flacons et dans l'autre série, nous avons supplémenté le milieu Kirk avec 2% de copeaux de bois. Les résultats ont indiqué une production plus élevée d'activité LiP dans le milieu modifié de Kirk avec 2% de copeaux de bois, mais la production d'activité MnP est demeurée faible (Fig. 6) (Voir la composition du milieu Kirk dans les méthodes).

De plus, nous avons observé que la production de ligninases était plus facile à réaliser en utilisant les copeaux de bois. Cela nous a motivé à apporter d'autres modifications au milieu azote-limitant de Kirk:

Nous avons remplacé le surfactant Tween 80 (0,05%) par le PEG 6000 (0,25%) (0,25% fut utilisé pour obtenir une même concentration molaire que 0,05% de Tween 80). Nous avons utilisé le PEG puisque

Fig. 6 : Comparaison du milieu Kirk original (azote-limitant)* avec le milieu Kirk azote-limitant modifié (2% copeaux de bois) sur la production de ligninases.



* (Tien et Kirk, 1988)

(marge d'erreur= 15,2%)

des activités élevées de ligninases ont été rapportées en utilisant ce surfactant par Janshekar et Fiechter (1988).

Nous avons aussi augmenté la concentration d'alcool vératrylique à 2,5 mM puisqu'il a été rapporté par Leisola et al. (1985) que des activités ligninases élevées ont été obtenues avec des concentrations comparables.

Dû à son coût très élevé, nous avons remplacé le tampon 2,2 diméthyl succinate par le tampon tartrate (25 mM) dont le pKa est plus près de 4,5 (pH optimal pour la production de ligninases), et le coût moindre.

L'extrait de levure est un ingrédient communément utilisé dans plusieurs milieux de culture de microbes puisqu'il permet de supporter une bonne croissance des microorganismes. Cet ingrédient n'est pas seulement une bonne source d'azote organique lentement assimilable, mais aussi une source riche en vitamines (dont la thiamine). De plus, cet ingrédient fournit une source de carbone lentement assimilable et certains minéraux. Pour toutes ces bonnes raisons, nous avons utilisé de l'extrait de levure dans le milieu Kirk, à raison de 2 g/L afin de conserver la balance en thiamine (1 mg/L) dans le milieu.

Enfin, dû à la présence d'extrait de levure et de copeaux de bois comme sources de carbone lentement assimilables dans le milieu, nous

avons réduit la quantité de glucose dans le milieu de moitié dans le milieu (0,5%).

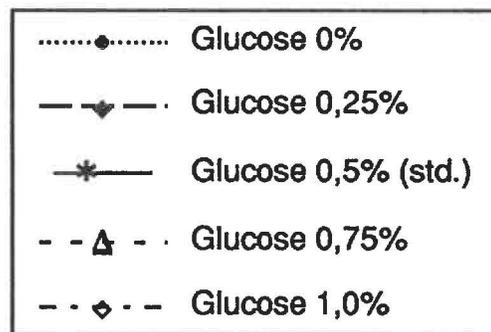
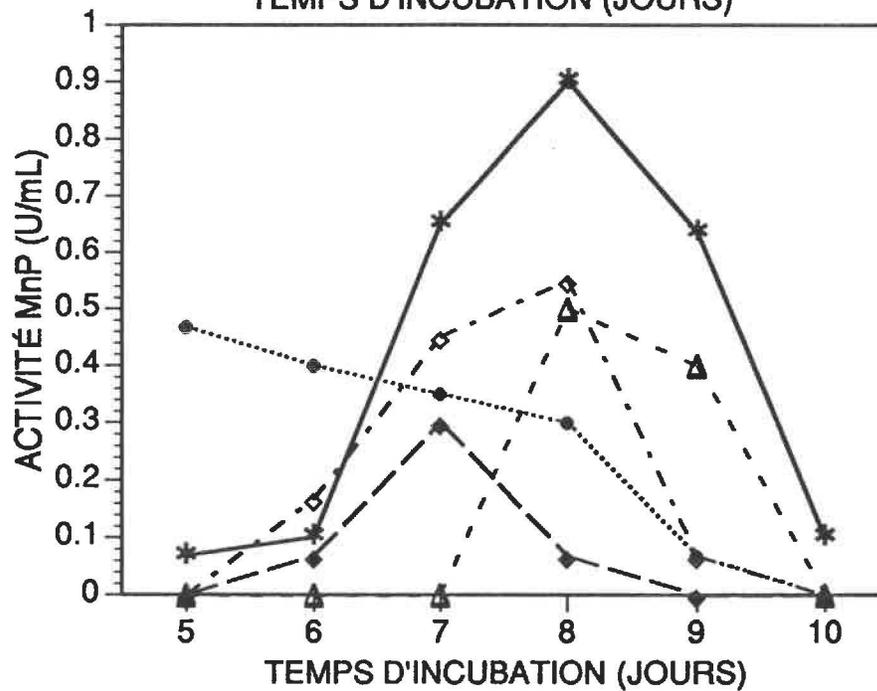
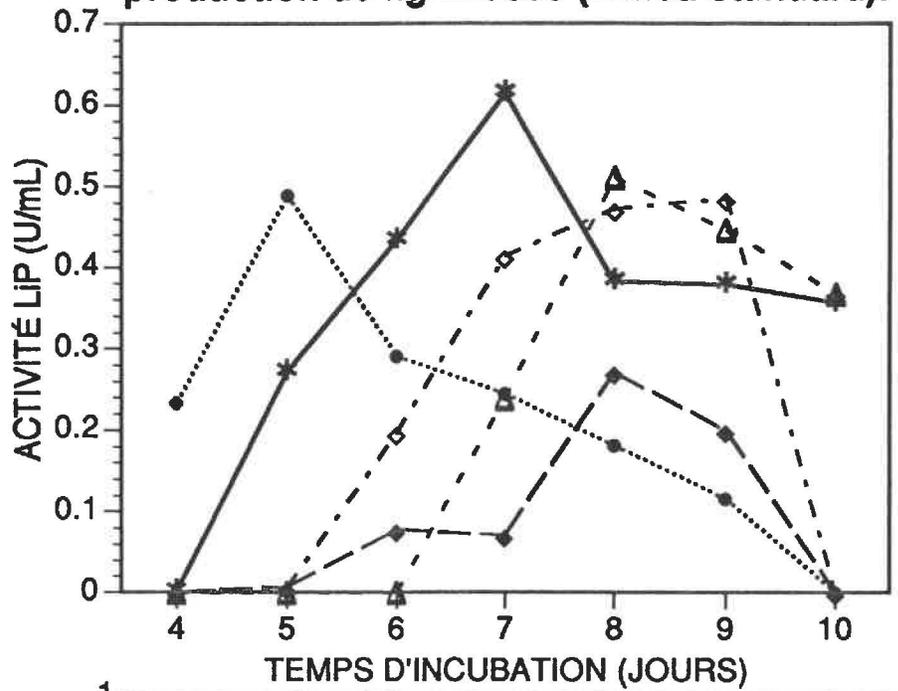
Donc, après toutes ces modifications dans le milieu Kirk limitant en azote, la nouvelle formulation du milieu devînt la suivante (par litre):

Copeaux de bois	20 g
Glucose	2 g
KH ₂ PO ₄	2 g
MgSO ₄	0,5 g
CaCl ₂	0,1 g
(NH ₄) ₂ Tartrate	0,20 g
Tampon Na-Tartrate	25 mM
Extrait de levure	2 g
Alcool vératrylique	2,5 mM
Solution d'éléments de Kirk	70 mL
PEG 6000	2,5 g
[Mn ²⁺]	11,15 ppm

Les conditions de cultures: pH= 4,5; Température=39°C; Agitation= 175 r.p.m., aération= 100% O₂, furent les mêmes que celles rapportées par Kirk (Tien et Kirk, 1988).

Dès que nous avons obtenu les résultats de cette expérience (Fig. 7), nous avons choisi de désigner ce milieu modifié de Kirk comme "milieu standard" de cette étude, à partir duquel chacunes des modifications effectuées (paramètres étudiés) ont été mentionnées dans cette expérience et les expériences suivantes.

Fig. 7 : Effet de la concentration de glucose sur la production de ligninases (milieu standard).



(marge d'erreur= 9,4%)

2.2. Effet de différentes concentrations de glucose sur la production de ligninases (milieu standard):

À partir du nouveau milieu formulé précédemment, contenant 0,5% de glucose, nous avons étudié la production de ligninases et avons comparé aussi l'effet de diverses concentrations de glucose sur la production de ligninases (Fig. 7). Les résultats furent déjà très encourageants, puisque des activités ligninases encore plus élevées et consistentes furent obtenues avec ce milieu par rapport à celles obtenues avec le milieu Kirk modifié avec 2% de copeaux de bois. De plus, des activités élevées de MnP, aussi bien que LiP ont été produites avec ce nouveau milieu.

Des activités maximales de LiP et MnP de 0,610 U/mL et 0,900 U/mL ont été obtenues à une concentration de glucose de 0,5% après 7 et 8 jours de fermentation, respectivement (Fig. 7). Avec des concentrations de glucose plus élevées que 0,5%, les activités des deux types de ligninases (LiP et MnP) diminuèrent considérablement. Avec 0,25% de glucose, des niveaux encore plus bas de ligninases furent obtenus. En absence de glucose, la disparition dès le 5^e jour d'incubation d'activités ligninases fut plus rapide qu'à toute autre concentration de glucose. Cependant, les activités maximales obtenues en absence de glucose furent inférieures à celles obtenues à 0,5%. Cela suggère qu'une concentration de glucose de 0% en présence de copeaux de bois dans le milieu crée une limitation en carbone dès le début de la fermentation, qui est responsable de l'apparition plus rapide de

production de ligninases. Ces observations ont orienté nos recherches pendant cette étude vers la mise au point d'un milieu que nous avons appelé "milieu C-limitant". C'est pourquoi, au cours de cette étude, un milieu C-limitant fut établi à partir des résultats obtenus avec le milieu standard, et comme pour le milieu standard, l'effet de divers paramètres fut aussi étudié avec le milieu C-limitant pour la mise au point d'un milieu et conditions optimales.

Il a déjà été rapporté (Bonnarme et al., 1991) que l'utilisation du glucose comme source de carbone permet de maintenir le métabolisme primaire du fungus (croissance de biomasse mycéliale), mais du même coup, le glucose a un effet répresseur sur le métabolisme secondaire (production de ligninases), et ce, jusqu'à son épuisement. Ce phénomène fut donc observé dans cette expérience par une apparition retardée de l'activité ligninase lorsque le milieu était supplémenté en glucose (Fig. 7). Cependant, une concentration de glucose de 0,5% a permis l'obtention d'activités ligninases (LiP et MnP) supérieures à toute autre concentration étudiée. Cela indique qu'une quantité suffisante de mycélium doit être synthétisée durant la phase de métabolisme primaire, pour affecter positivement la production de ligninases durant le métabolisme secondaire: probablement que cela permet une période de viabilité mycéliale plus longue et plus active durant la phase de métabolisme secondaire de production de ligninases, puisque l'entrée en phase de métabolisme secondaire correspond aussi au début de l'autocatabolisme de la biomasse mycéliale, dû à la production de protéases (Bonnarme et Jeffries, 1991).

Pourquoi alors des concentrations de glucose supérieures à 0,5% n'ont pas permis de produire des activités ligninase comparables ou plus élevées?

À de tels niveaux de glucose dans le milieu, une grande quantité de biomasse mycéliale synthétisée peut causer une déficience en azote dans le milieu pour la biosynthèse de protéines et enzymes (dont les ligninases), puisqu'il faut rappeler que le milieu standard est un milieu limitant en azote contenant 0,20 g/L de diammonium tartrate. Donc, il est évident et établi (Bonnarme et Jeffries, 1991) que le ratio carbone/azote doit être bien balancé pour combiner une croissance mycéliale et une production de ligninases optimales.

2.3. Effet de la concentration de glycérol sur la production de ligninases (milieu standard, sans glucose):

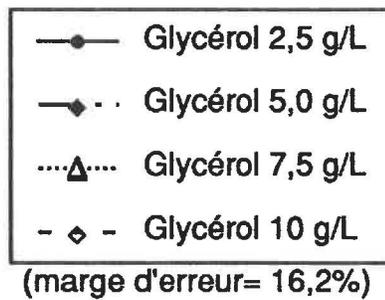
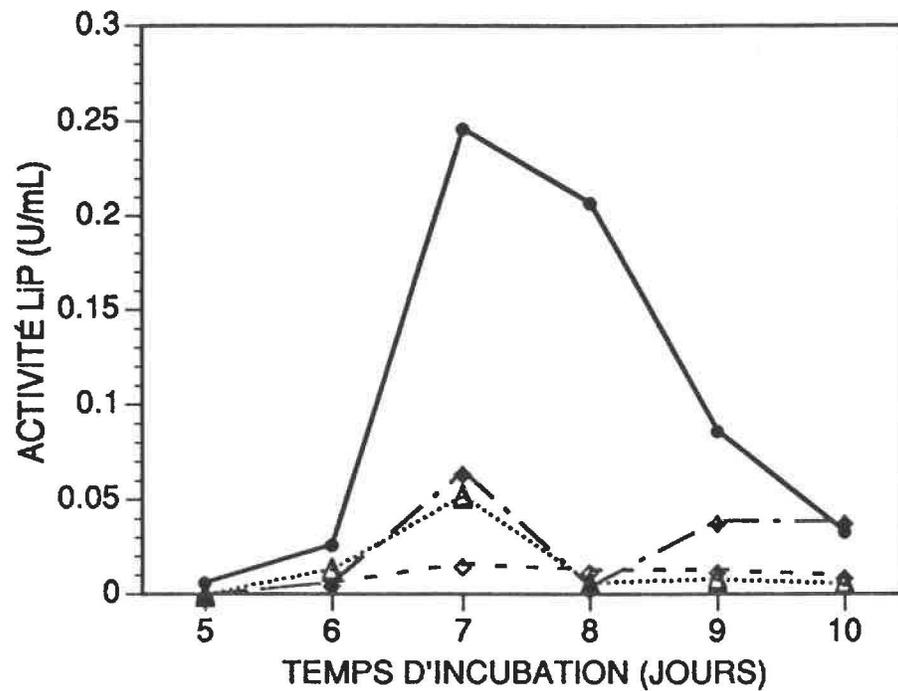
La production de ligninases en milieu de culture contenant du glycérol comme seule source de carbone et d'énergie fut rapportée par Asther et Corrieu (1987) avec une souche mutante de *P. chrysosporium* (souche INA-12). Ce mutant de la souche parentale (ATCC-24725), est génétiquement dé-réprimé pour la production de ligninases en conditions non-limitantes en carbone et d'azote. Des niveaux supérieurs d'activité ligninase (LiP) ont été rapportés avec cette souche vs. notre souche parentale.

Dans cette expérience, nous avons étudié l'effet de diverses concentrations de glycérol (Fig. 8), et avons observé qu'une augmentation de la concentration de glycérol résulte en une diminution de l'activité LiP (aucune activité MnP n'a pu être détectable). L'activité maximale LiP (0,25 U/mL) obtenue à la faible concentration de 0,25% de glycérol est très faible comparativement à celles obtenues avec des concentrations de glucose de 0,25 et 0,5%. Ces résultats indiquent que le glycérol n'est pas une bonne source de carbone pour la production de ligninases avec *P. chrysosporium* (ATCC-24725).

2.4. Effet de différentes concentrations de Polyéthylène-glycol (PEG 6000) sur la production de ligninases (milieu standard et C-limitant):

Il a déjà été établi (Jäger et al., 1985; Faison et Kirk, 1985) que les surfactants ont un rôle important dans la production de ligninases en cultures liquides agitées, même si le mécanisme par lequel ils stimulent la production de ligninases n'est pas encore clair. Dans une production à grande échelle de ligninases en fermenteur conventionnel à turbines de 42 litres, l'utilisation de polyéthylène-glycol 2000 a permis d'obtenir les meilleures activités LiP vs. d'autres surfactants (Janshekar et Fiechter, 1988). Cela a orienté notre étude vers l'utilisation de ce type de composé dans notre milieu de fermentation. Premièrement, nous avons étudié l'effet de diverses

Fig. 8 : Effet de la concentration de glycérol sur la production de ligninases (milieu standard, 0% glucose).



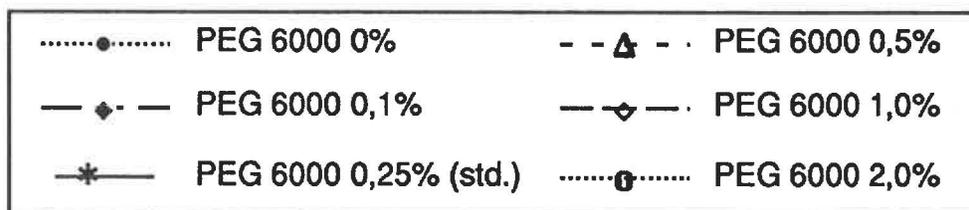
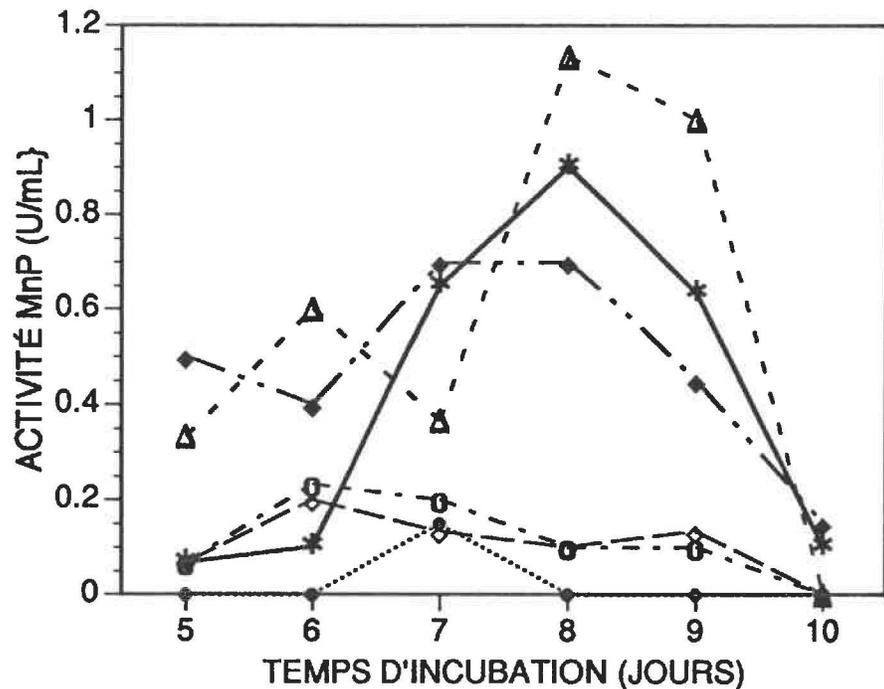
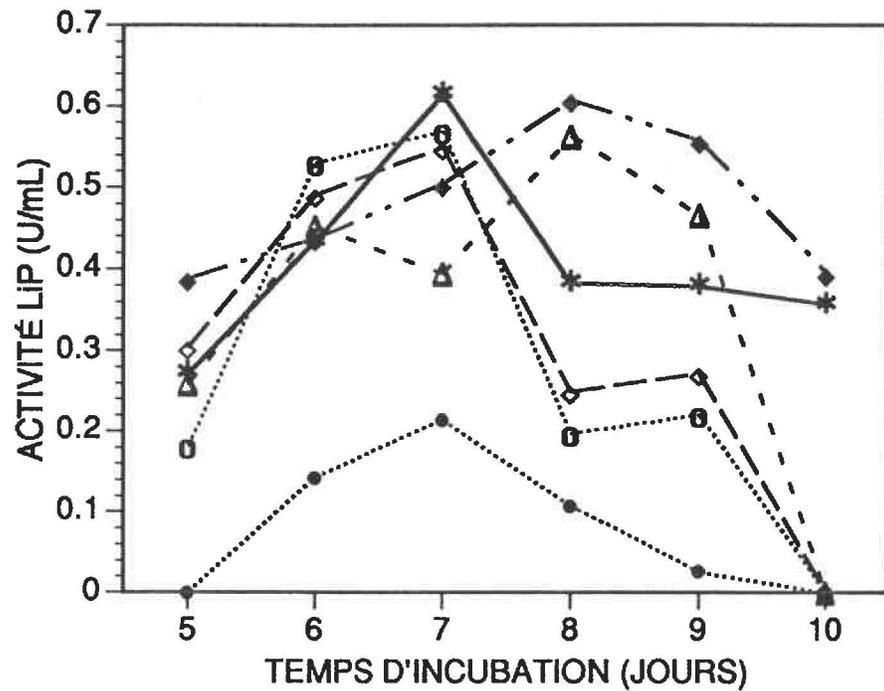
concentrations de PEG 6000 en milieu standard (Fig. 9), et plus tard, en milieu carbone-limitant contenant une concentration de manganèse ([Mn]) de 40 ppm (Fig. 10), afin d'établir sa concentration optimale.

L'activité ligninase maximale (LiP) fut observée à des concentrations allant de 0,1% à 2,0% de PEG 6000 avec le milieu standard, mais l'activité maximale de MnP fut observée seulement avec des concentrations de 0,25% et 0,5% (Fig. 9). En absence de PEG 6000, une diminution significative d'activité pour les deux types de ligninases a démontré l'importance de l'utilisation de cet additif dans le milieu de culture pour une production optimale de ligninases.

Dans le milieu carbone-limitant (Fig. 10), les activités ligninases (LiP et MnP) furent obtenues avec les concentrations de 0,25% et 0,5% de PEG 6000. Cependant, dans ce milieu, les niveaux d'activité obtenus furent plus élevés que ceux obtenus avec le milieu standard. L'activité MnP fut augmentée de quatre fois en milieu C-limitant vs. en milieu standard. Là encore, il a été observé qu'en absence de PEG 6000, l'activité LiP diminue considérablement, alors qu'aucune activité MnP n'a pu être observée.

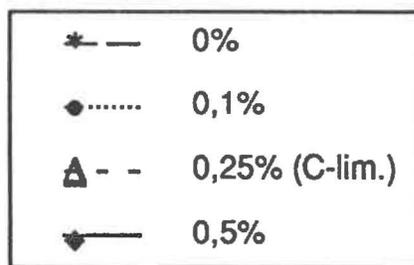
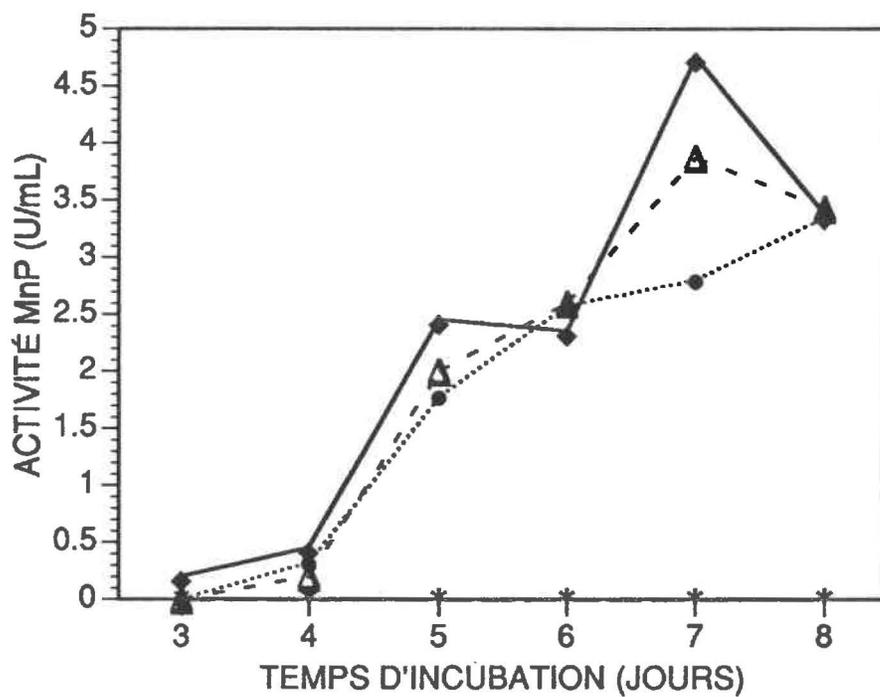
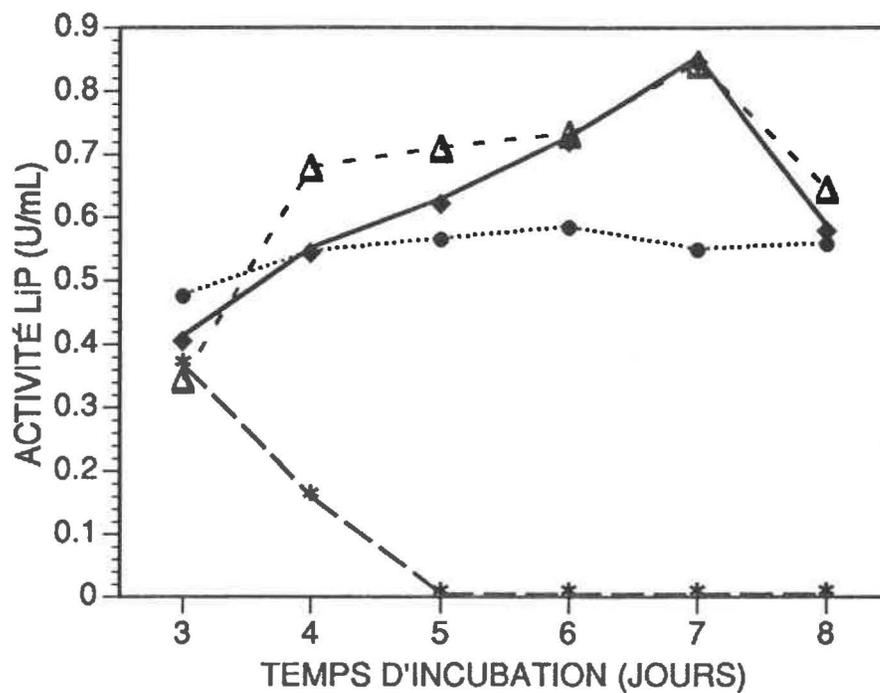
À partir de ces résultats, nous pouvons déduire que la concentration optimale de PEG 6000 est de 0,25% pour les deux types de ligninases, et ce, pour le milieu standard et le milieu C-limitant.

Fig. 9 : Effet de la concentration de polyethylene-glycol (PEG 6000) sur la production de ligninases (milieu standard).



(marge d'erreur= 10,1%)

Fig. 10 : Effet de la concentration de polyethylene-glycol (PEG 6000) sur la production de ligninases. (milieu C-limitant, [Mn] = 40 ppm.).



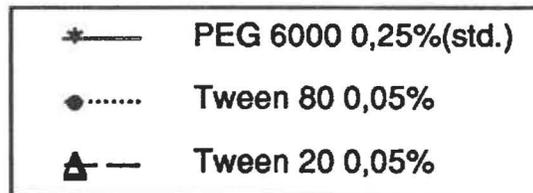
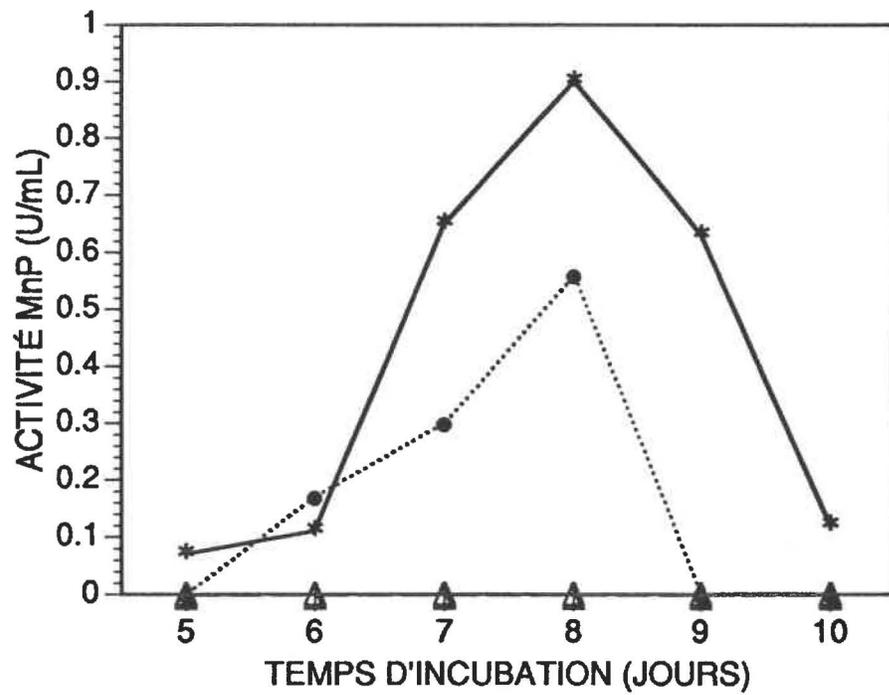
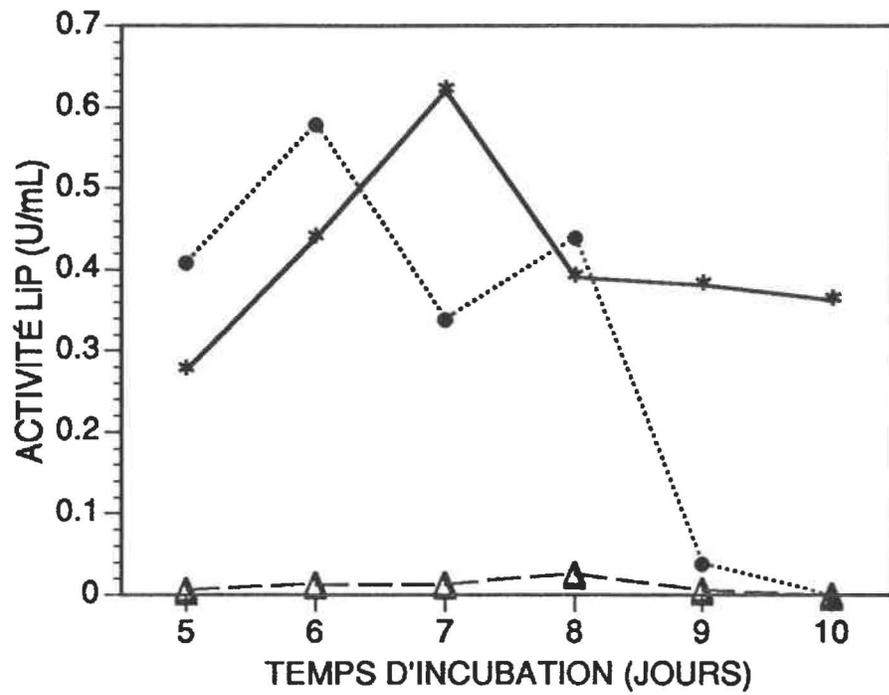
(marge d'erreur= 10,2%)

2.5. Effet des Tweens (surfactants) sur la production de ligninases (milieu standard et C-limitant):

Dans cette expérience, nous avons comparé l'effet du PEG 6000 avec celui d'autres surfactants: Tween 80 et Tween 20. Les concentrations de Tween 20 et Tween 80 utilisées (0,05%) correspondent aux concentrations optimales rapportées dans la littérature (Jäger et al., 1985), alors que celle de PEG 6000 (0,25%) est la concentration optimale obtenue dans cette étude. Les résultats présentés en figure 11 indiquent qu'en milieu standard, le PEG 6000 (0,25%) a permis l'obtention des activités ligninases les plus élevées, tel qu'observé dans les résultats précédents (Fig. 9 et 10). Avec le Tween 20, presque aucune activité ligninase fut détectée. Cependant, le Tween 80 semble être aussi favorable que le PEG 6000, pour la production d'activité LiP, mais pas favorable pour la production de MnP.

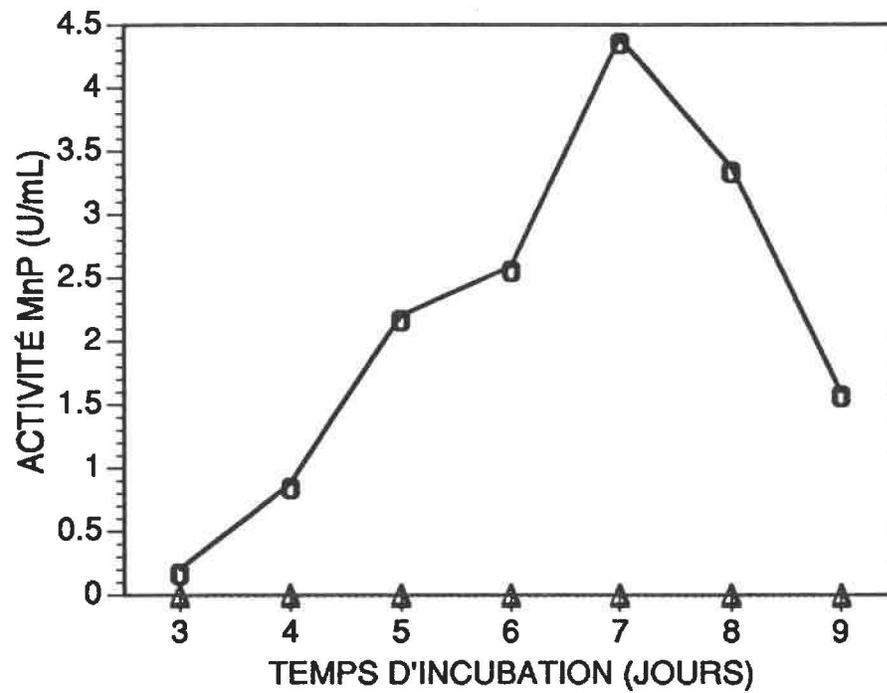
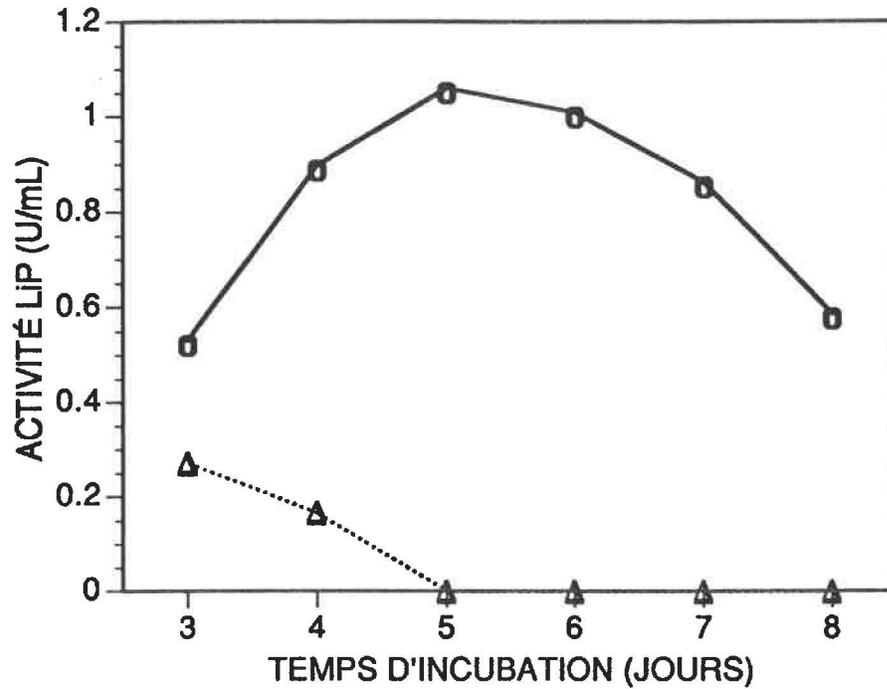
Dans le milieu C-limitant (Fig. 12), les activités supérieures de ligninases (LiP et MnP) furent obtenues de nouveau avec le PEG 6000. Dans ce cas-ci, presque aucune activité ligninase fut obtenue avec le Tween 80. Comme le Tween 20 n'a pas permis d'obtenir aucune activité dans ces résultats (Fig. 11-12), il a donc été exclu dans les expériences suivantes. Les mécanismes exactes par lesquels ces surfactants peuvent augmenter la production de ligninases avec les

Fig. 11 : Effet de divers surfactants (concentrations optimales) sur la production de ligninase (milieu standard).



(marge d'erreur= 12,0%)

Fig. 12 : Effet de divers surfactants sur la production de ligninases (milieu C-limitant, [Mn]= 40 ppm).



....▲.... Tween 80 (0,05%)
—●— PEG 6000 (0,25%) (C-lim.)

(marge d'erreur= 9,2%)

fongus filamenteux (comme *P. chrysosporium*) n'est pas encore claire, mais nous savons que ces composés ont un rôle en commun: ils jouent un rôle dans la physiologie des membranes, favorisant la fluidité et la perméabilité (Reese et Maguire, 1969; Takao et al., 1984), et pourraient aussi affecter le métabolisme cellulaire (Janshekar et Fiechter, 1988). Aussi, la structure moléculaire du PEG 6000 est importante à considérer, puisqu'elle est très différente de la structure des Tweens, donc il se pourrait qu'elle ait des propriétés physico-chimiques différentes dans la membrane cellulaire. Il se pourrait aussi que le PEG 6000 ait des effets sur le métabolisme cellulaire si ce composé peut être métabolisable par le fongus.

2.6. Effet de la combinaison de surfactants et lipides (source de carbone) sur la production de ligninases (milieu standard sans glucose):

Asther et al. (1986) ont démontré avec la souche mutante *P. chrysosporium* (INA-12) que l'utilisation de Tween 80 (0,05%), d'acide oléique (0,08%) seule ou émulsifiée (0,04%) avec Tween 80 (0,05%) peut affecter positivement la production de ligninases. D'autres recherches (Schiesser et al., 1989) avec *Pleurotus ostreatus floridae* ont aussi démontré un effet positif sur la ligninolyse et la production de ligninases en ajoutant une petite quantité (0,1% à 0,5%) d'huile de tournesol dans le milieu.

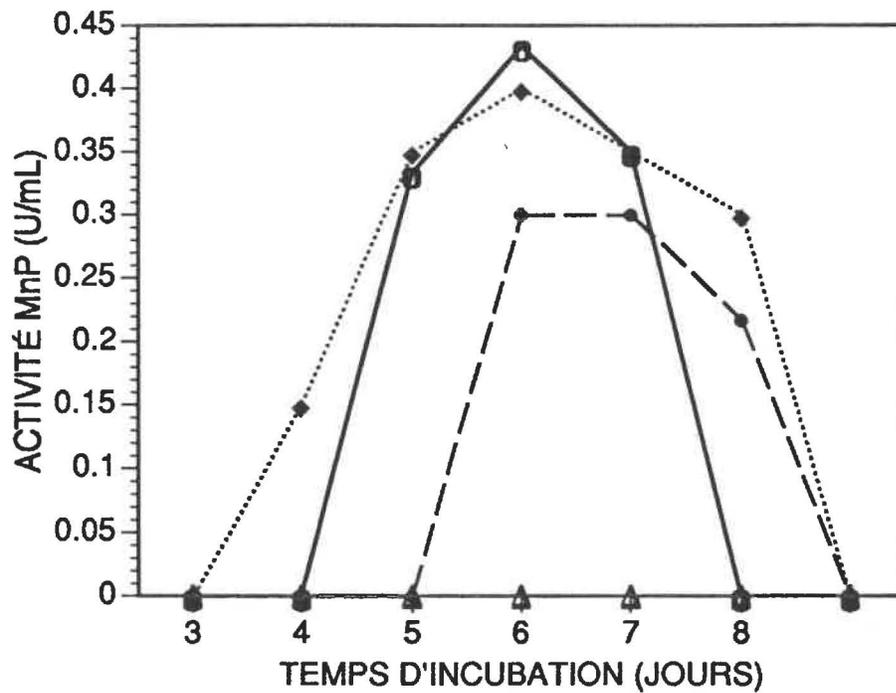
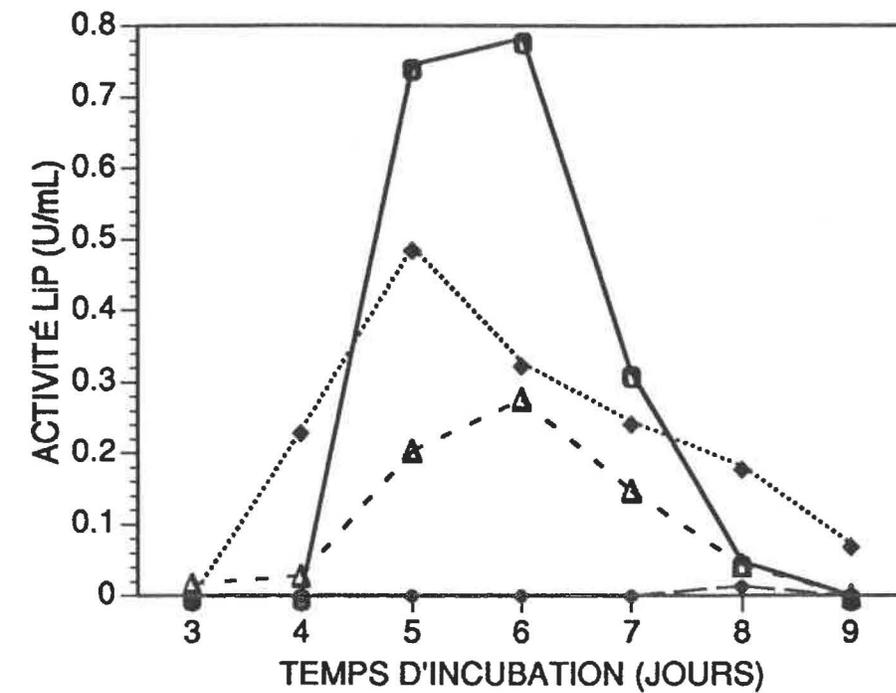
Dans cette expérience, l'effet de l'huile d'arachides avec différents surfactants fut étudié en milieu standard sans glucose (Fig. 13). Les résultats furent comparés avec ceux des surfactants utilisés seuls ou en combinaison, comme suit:

PEG 6000 (0,25%); Tween 80 (0,05%); PEG 6000 (0,25%) + huile d'arachides (0,35%); Tween (0,05%) + huile d'arachides (0,35%); et PEG 6000 (0,25%) + Tween 80 (0,05%).

Les résultats présentés en figure 13 indiquent que les activités ligninases les plus élevées furent obtenues en utilisant le mélange de PEG 6000 et d'huile d'arachides, suivi par le PEG 6000 utilisé seul. Il n'y avait pratiquement aucune activité LiP détectable en utilisant Tween 80, mais l'activité MnP fut cependant près des meilleures valeurs obtenues. L'effet presque inverse fut obtenu avec le mélange de Tween 80 et d'huile d'arachides (aucune activité MnP, mais activité LiP significative).

Une turbidité blanchâtre fut observée dans les milieux contenant de l'huile d'arachides ou du Tween 80 seuls ou mélangés. Le Tween 80 est composé de triglycérides et de diglycérides contenant principalement de l'acide linoléique comme acide gras, et l'apparition de turbidité blanchâtre dans les premiers jours de fermentation en présence de ces composés pourrait être probablement due à une déesterification des glycérides, libérant des acides gras qui peuvent être émulsifiées avec des protéines fongiques, formant une turbidité

Fig.13 : Effet de la combinaison de divers surfactants et lipides sur la production de ligninases (milieu standard, 0% glucose).



-◆..... PEG 6000 (0,25%) (std.)
 - Tween 80 (0,05%)
 - - ▲ - - Huile d'arachides (0,35%) + Tween 80 (0,05%)
 - Huile d'arachides (0,35%) + PEG 6000 (0,5%)
- (marge d'erreur= 13,8%)

blanchâtre dans le milieu. Dans cette expérience, le glucose n'a pas été utilisé, ce qui aurait stimulé le métabolisme de l'huile, comme source de carbone la plus facilement disponible dans le milieu, mais contrairement au glucose, l'huile ne semble pas avoir d'effet répressif sur le métabolisme secondaire, tel qu'observé par une apparition hâtive d'activités ligninases élevées. Il semble plutôt que l'huile stimule le métabolisme secondaire de la biodégradation oxydative de la lignine et de la production de ligninases, puisque le métabolisme des lipides est aussi un métabolisme oxydatif. Schiesser et al. (1989) ont rapporté avec *Pleurotus ostreatus floridae* que la présence d'huile de tournesol favorise le rendement de biomasse, l'activité laccase, ainsi que la biodégradation de la lignine, alors que le système d'enzymes cellulolytiques est moins actif et pas complètement exprimé dans ces conditions.

Donc nous pouvons conclure de cette expérience que la combinaison de PEG 6000 (0,25%) avec une source de lipides (huile d'arachides, 0,35%) en absence de glucose sont des conditions permettant une production de LiP supérieure à celles obtenues en milieu standard. Ces conditions ont été utilisées plus tard dans notre milieu C-limitant.

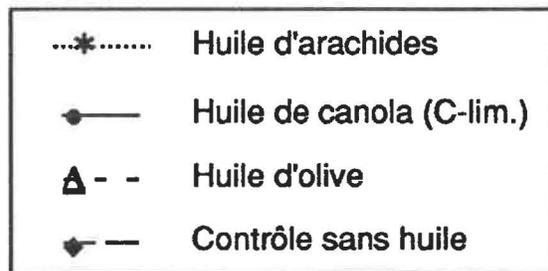
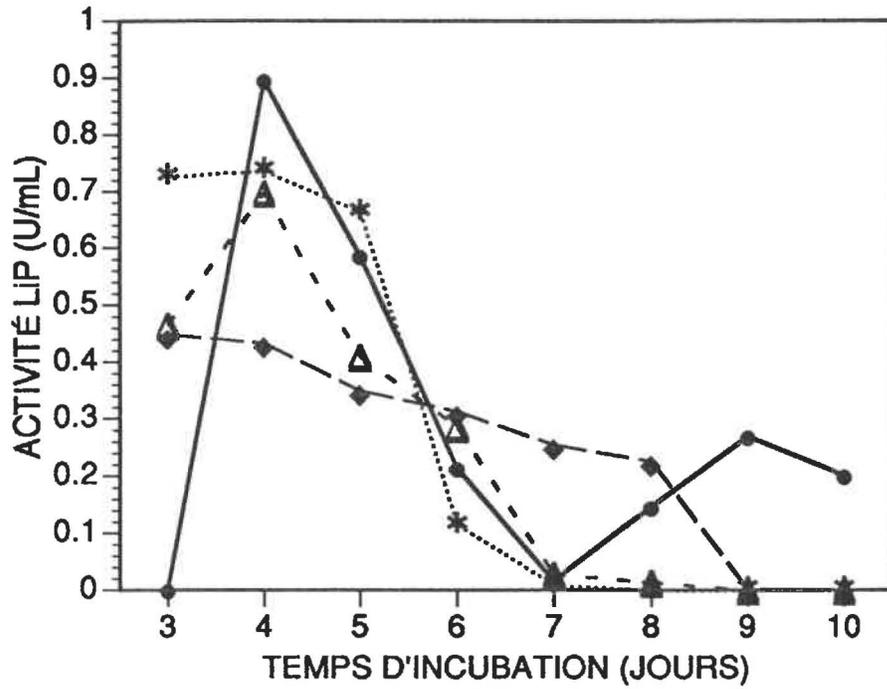
2.7. Effet de différentes sources de lipides (0,35%) sur la production de ligninases (Milieu C-limitant, [Mn]= 11,1 ppm):

Il a été rapporté par Asther et al. (1988 a,b) avec le mutant INA-12 de *P. chrysosporium* que la supplémentation du milieu avec des huiles riches en acide oléique (un acide gras C18:1 monoinsaturé) résulte en une augmentation de l'activité ligninase (LiP).

Dans cette expérience (Fig. 14), nous avons comparé l'effet d'une huile contenant une grande proportion d'acide oléique (huile d'olive) avec une huile contenant une grande proportion d'acide linoléique (huile d'arachides), et l'huile de canola contenant 93% d'acides gras insaturés dont les deux tiers sont monoinsaturés et l'autre tiers est polyinsaturé. D'après les résultats obtenus, il est possible qu'une combinaison d'acides gras telle que celle présente dans l'huile de canola est plus favorable pour la production de ligninases que les autres huiles utilisées.

Les résultats indiquent une augmentation d'activité LiP (aucune activité MnP ne fut détectable) en présence de chaque type d'huile, comparativement au témoin sans huile (Fig. 14). Le maximum d'activité LiP fut obtenu avec l'huile de canola et le profil d'activité LiP fut comparable pour les deux autres types d'huiles. Cependant, la stabilité des enzymes semble être diminuée en présence d'huiles, tel qu'observé par une diminution rapide des activités avec chaque type

Fig. 14 : Effet de divers types d'huiles (0,35%) sur la production de ligninases (milieu C-limitant).



(marge d'erreur= 8,8%)

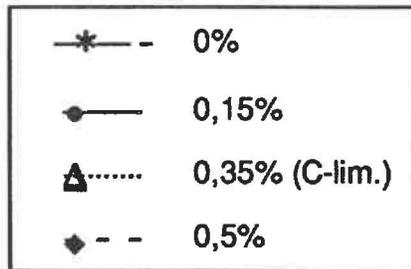
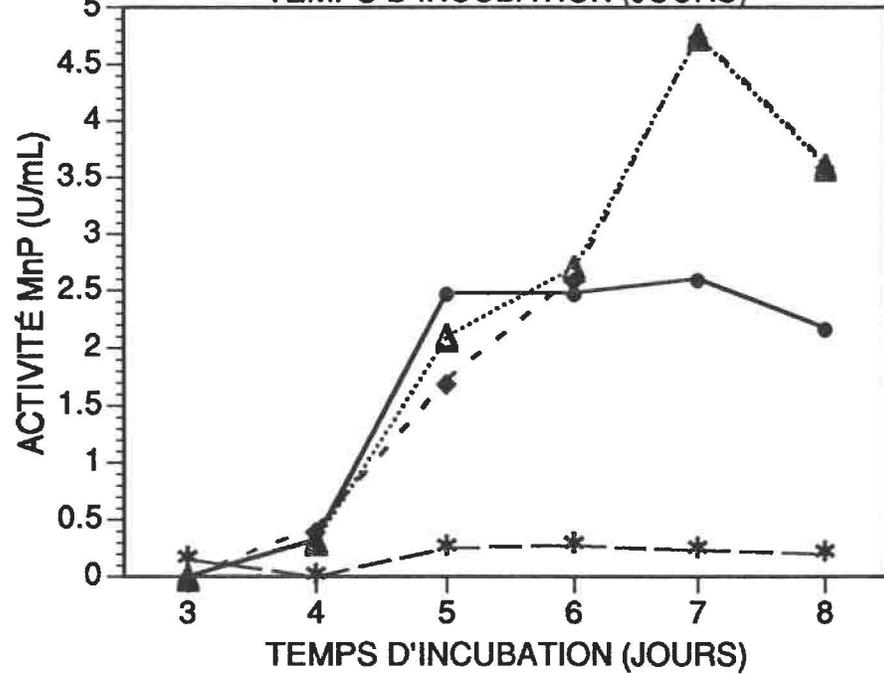
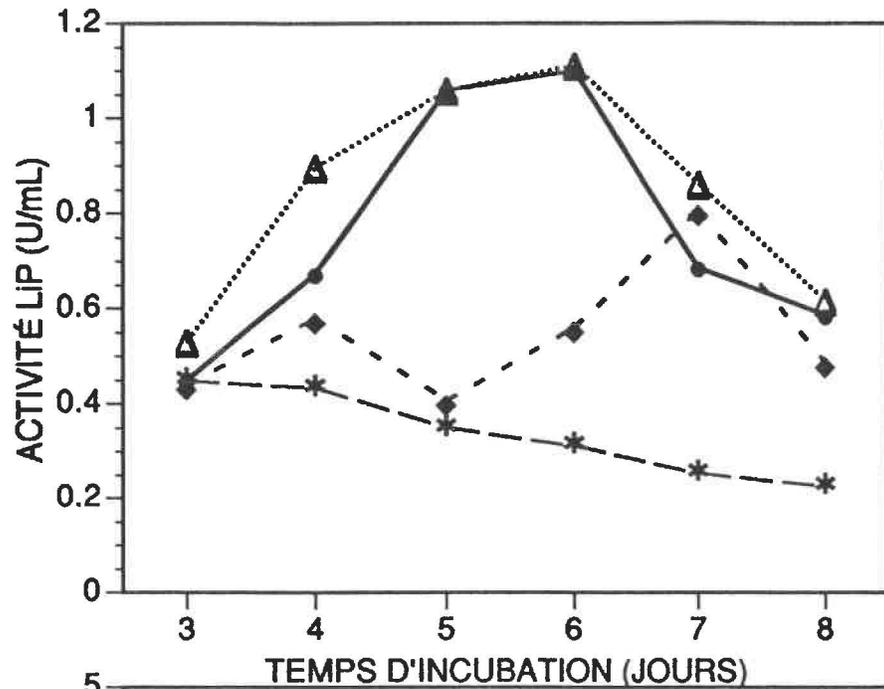
d'huile utilisé. Ces résultats sont intéressants, puisque l'huile de canola est moins coûteuse que les autres huiles comparées et permet une production supérieure en LiP.

2.8. Effet de différentes concentrations d'huile de canola sur la production de ligninases (Milieu C-limitant, [Mn]= 40 ppm):

Comme l'huile de canola s'est avérée plus favorable que les autres huiles pour la production de ligninases en milieu C-limitant (Fig. 14), nous avons donc considéré nécessaire d'étudier l'effet de la concentration de cette huile végétale sur la production de ligninases.

Les résultats présentés en figure 15 indiquent qu'une concentration de 0,15% et 0,35% d'huile de canola permettent la production d'activités LiP maximales comparables, alors que des concentrations de 0,35% et 0,5% permettent l'obtention de niveaux maximaux et comparables d'activité MnP. Globalement, les résultats indiquent donc que 0,35% d'huile de canola est la concentration optimale puisque elle permet l'obtention d'activités maximales pour les deux types de ligninases.

Fig. 15 : Effet de la concentration d'huile de canola (%) sur la production de ligninases (milieu C-limitant, [Mn] = 40 ppm)



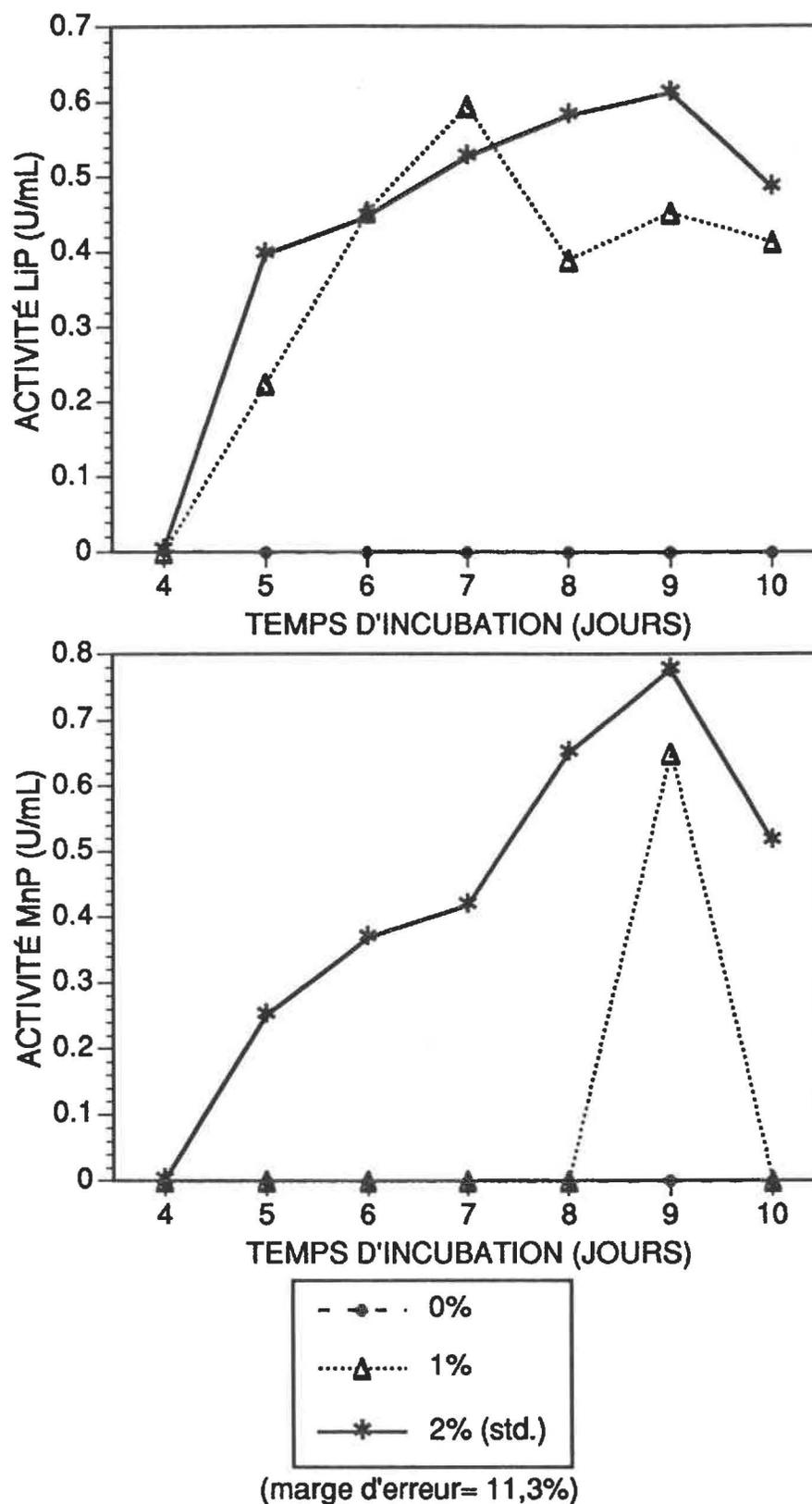
(marge d'erreur= 11,4%)

2.9. Effet de différentes concentrations de copeaux de bois sur la production de ligninases (milieu standard):

L'utilisation de lignocelluloses pour la production de ligninases avec *P. chrysosporium* a été rapportée dans très peu d'études (Leisola et al., 1985; Tran et Chambers, 1987; Boyle et al., 1992), et parmi celles-ci, aucune ne rapporte spécifiquement l'utilisation de copeaux de bois. Les lignocelluloses sont les sources de carbone renouvelables les plus abondantes et les moins dispendieuses dans la nature, et l'utilisation de tels substrats pour diverses applications dont la production de ligninases serait une bonne approche pour réduire les coûts de production de ces enzymes. C'est pourquoi le but principal de ce projet de recherche fut d'établir les conditions optimales pour la production de ligninases en utilisant une matière lignocellulosique comme les copeaux de bois. Les premières expériences ont révélé que l'addition de copeaux de bois dans le milieu favorisent la production de ligninases. Donc, il était nécessaire de déterminer la concentration optimale de copeaux de bois dans le milieu.

Les résultats obtenus dans cette expérience ont clairement indiqué que seulement en présence de copeaux de bois, la production de ligninases est observée dans notre milieu standard (Fig. 16). La production de LiP fut comparable à 1% et 2% de copeaux de bois, mais seulement à 2% de copeaux de bois, nous avons observé une progression consistante et soutenue de l'activité MnP, et celle-ci fut plus élevée qu'à 1% de copeaux de bois où seulement après 9 jours de

Fig. 16 : Effet de la concentration de copeaux de bois sur la production de ligninases (milieu standard).



fermentation, une activité comparable fut observée. Dans cette expérience, il n'était pas possible d'utiliser une concentration de copeaux de bois de 3%, dû à des problèmes d'agitation.

La plupart des études rapportées à ce jour utilisaient le glucose comme seule source de carbone et d'énergie. Cependant, les niveaux de ligninases obtenus dans de telles conditions étaient plutôt modestes comparativement avec ceux obtenus avec notre milieu standard à base de copeaux de bois.

En absence de copeaux de bois, nous avons toutefois observé une production de ligninases dans les milieux rapportés par Jeffries (Perez et Jeffries, 1992) et Kirk (Tien et Kirk, 1988), contenant 1% de glucose, mais les niveaux d'activités obtenues furent généralement bas et il y avait un manque de consistance (reproductibilité) dans les résultats obtenus. Or, les avantages du milieu standard à base de copeaux de bois sont les bonnes activités ligninases qui sont obtenues, et une meilleure consistance dans les activités obtenues dans chaque flacon de chaque triplicata utilisé pour chaque valeur d'activité obtenue.

La présence de lignine dans le bois et la différente morphologie du fungus observée en milieu à base de copeaux de bois (sous forme de suspension mycéliale plutôt qu'en pelotes mycéliales) serait responsable, pour certaines raisons physiologiques, de l'augmentation de la production de ligninases. De plus, la solubilisation physique ou dégradation enzymatique de la lignine de ces copeaux de bois dans le

milieu pourrait avoir un effet inducteur sur la production de ligninases.

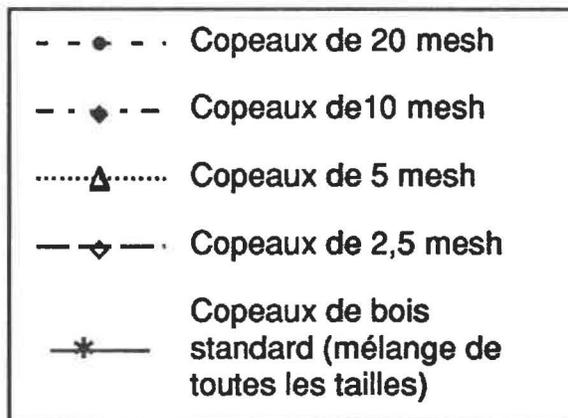
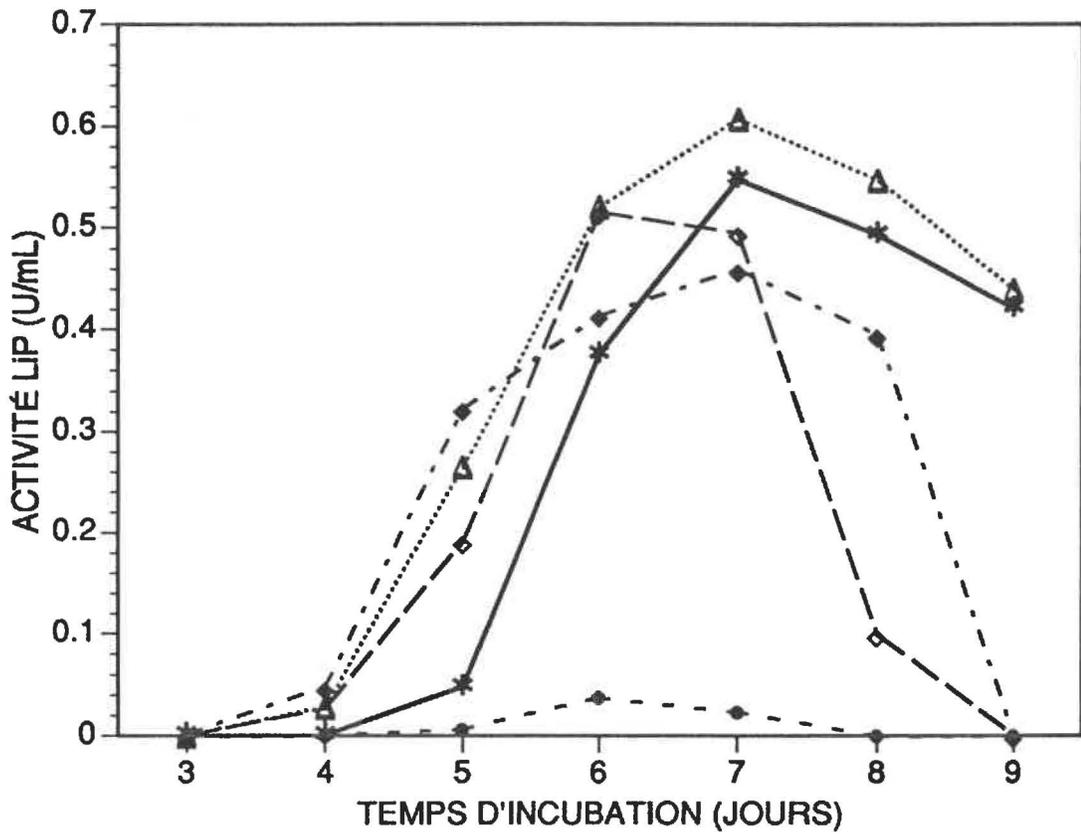
2.10. Effet de différentes tailles de copeaux de bois sur la production de ligninases dans diverses conditions:

Les expériences sur l'étude de l'effet de la taille des particules de bois furent effectuées dans le but d'établir s'il existe une taille optimale pour la production de ligninases et si oui, quelle est la taille optimale, et ce, sous différentes conditions de concentration en carbone et d'azote.

Dans ces expériences (Fig. 17, 18, 19), les copeaux de bois standard sont un mélange de particules de bois de tailles variant majoritairement (à 90% du poids total) entre 5 et 2,5 mesh, les particules de tailles de 10 à 20 mesh formant seulement 10% du poids total. Pour obtenir différentes tailles de particules de bois, des copeaux de bois standard furent séparés, à l'aide de tamis, en particules de 10 mesh, 5 mesh, et 2,5 mesh. Des particules d'une taille de 20 mesh furent obtenus par mouture à l'aide d'un moulin Wiley.

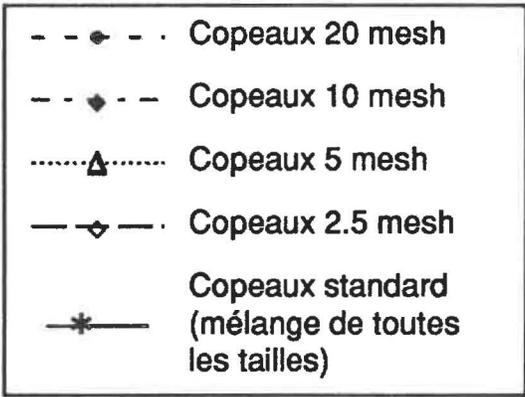
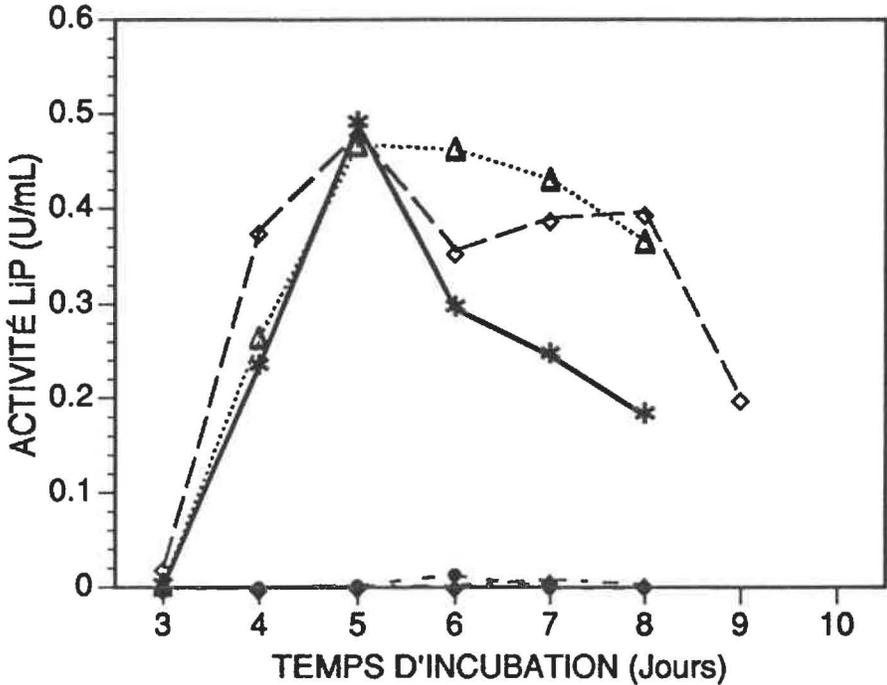
Les résultats indiquent que généralement, dans chaque milieu étudié (Fig. 17-19), les tailles de copeaux de bois variant entre 10 mesh à des tailles plus grandes (5 mesh, 2,5 mesh et copeaux standard) ont permis de produire des activités LiP variant entre 0,3 à environ 0,6 U/mL, alors qu'avec une taille de 20 mesh, il n'y avait

Fig. 17 : Effet de la taille des copeaux de bois (mesh) sur la production de ligninases (milieu standard).



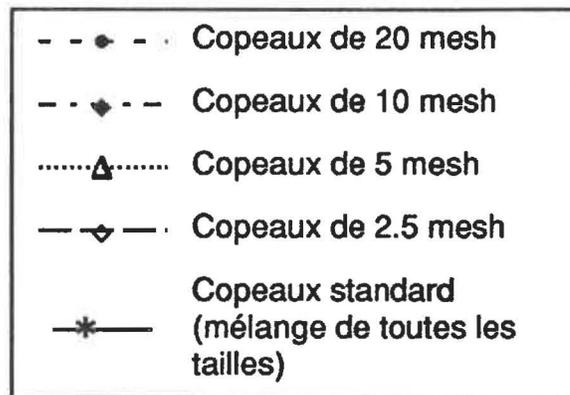
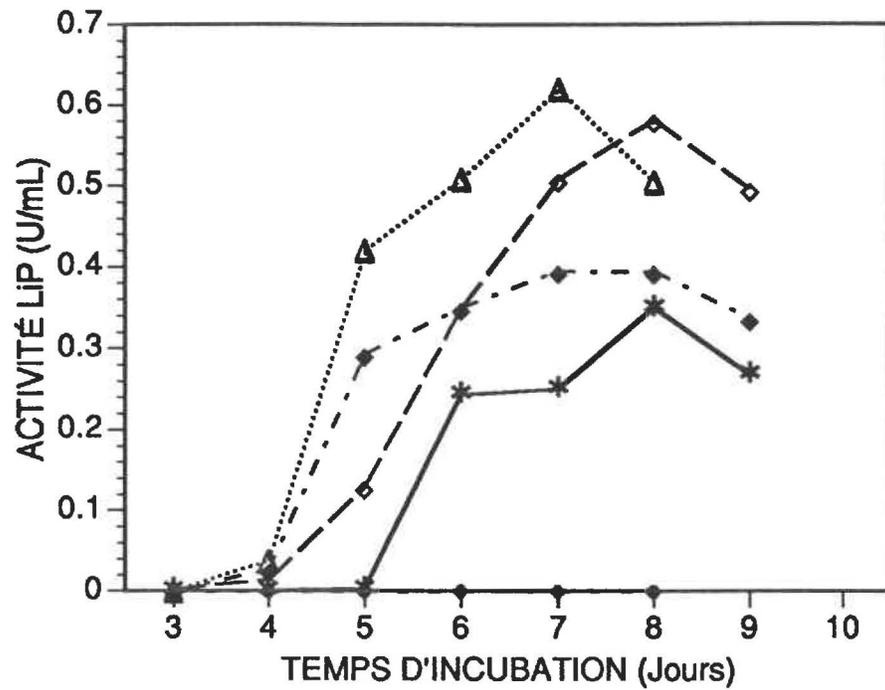
(marge d'erreur= 9,7%)

Fig. 18 : Effet de la taille des copeaux de bois (mesh) sur la production de ligninases (milieu standard, 0% glucose).



(marge d'erreur= 13,1%)

Fig. 19 : Effet de la taille des copeaux de bois (mesh) sur la production de ligninases (milieu standard, 0.25% glucose, 0.66g/L diammonium tartrate).



(marge d'erreur= 12,0%)

pratiquement aucune activité LiP dans presque tous les milieux étudiés. Les activités LiP maximales furent obtenues avec des particules de bois de 5 mesh dans presque tous les milieux étudiés, excepté dans le milieu standard sans glucose, où presque les mêmes activités maximales de LiP furent obtenues avec 5 mesh, 2,5 mesh et les copeaux de bois standard. Dans le milieu standard modifié (0,25% glucose, 0,66 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{Tartrate}$) (Fig. 19), un délai de 4 jours dans l'apparition d'activité LiP fut observé, ce qui s'explique par un délai dans l'apparition du métabolisme secondaire (limitation en azote) dû à la présence d'un surplus d'azote fourni par le diammonium tartrate par rapport aux conditions standard. (L'activité MnP n'était pas détectable dans ces expériences).

Ces résultats indiquent qu'à des tailles de particules de bois de 20 mesh, aucune production de ligninases n'est possible. Une explication tangible de l'absence de production de ligninases avec des particules de bois de 20 mesh (bois moulu) est la suivante: lorsque les particules de bois sont si fines, la cellulose du bois devient plus facilement disponible pour les cellulases, et peut donc être assimilable comme source de carbone. Dans de telles conditions, la disponibilité des hydrates de carbone fournis par le bois moulu ne créent plus de limitation en carbone nécessaire pour l'induction du métabolisme secondaire de production de ligninases, mais stimule plutôt le métabolisme primaire de croissance active du fungus, tel qu'observé par une texture épaisse du milieu, et des changements importants de pH, dus à une croissance active de biomasse mycéliale dans le milieu.

Donc, le bois moulu a favorisé le maintien du métabolisme primaire sur les polysaccharides du bois, et a réprimé le métabolisme secondaire, donc aucune production de ligninase ne fut observée.

2.11. Effet de diverses sources d'azote organique sur la production de ligninases (milieu standard):

Après le carbone et l'oxygène, l'azote est le troisième élément cellulaire le plus abondant (en matière sèche). Conséquemment, la source d'azote est généralement la substance la plus abondante dans le milieu de fermentation après la source de carbone. Les sources d'azote sont métabolisées par les microorganismes pour fournir cet élément (l'azote) pour les biosynthèses anaboliques en substances cellulaires azotées telles que les acides aminés, pyrimidines, et leurs polymères (protéines, ARN, ADN). Comme pour les sources de carbone, les sources d'azote peuvent aussi être utilisées par certains microorganismes pour générer de l'énergie métabolique. Puisque les acides aminés et les bases azotées contiennent du carbone et de l'azote, ils peuvent occasionnellement être fournis comme seule source de carbone, d'azote, et d'énergie. Plusieurs fermentations commerciales utilisent des sources complexes d'azote organique, qui sont habituellement des sous-produits d'industries agricoles et de transformation des aliments. Ces matières sont moins dispendieuses que les sources pures d'azote organique utilisées en milieux synthétiques, et peuvent fournir une variété de vitamines, minéraux, et facteurs de croissance. Les fermentations industrielles sont généralement plus rapides et efficaces

lorsque ces ingrédients sont utilisés puisqu'ils diminuent le nombre de composés qu'autrement les cellules auraient à synthétiser *de novo*. Comme les hydrates de carbone, la disponibilité des sources d'azote organique doit être considérée en plus de la quantité d'azote nécessaire dans le milieu de fermentation. Les protéines, par exemple, peuvent seulement être assimilées par des microorganismes qui sécrètent des protéases extracellulaires pouvant hydrolyser enzymatiquement les protéines en acides aminés. Les microorganismes dépourvus de cette propriété ont besoin d'hydrolysats protéiques, de peptones, ou de digestats composés d'acides aminés libres (Traders Protein Co., 1988).

A notre connaissance, aucune étude antérieure sur la production de ligninases avec *P. chrysosporium* n'a été réalisée pour évaluer l'effet de différentes sources d'azote organique. Donc, cette expérience fut effectuée dans le but d'évaluer l'effet de diverses sources d'azote organique: Extrait de levure, extrait de boeuf, protéose peptone (hydrolysat de viande), soytone (hydrolysat de protéines de soya), caséine, casamino acids (hydrolysat acide de caséine), farine de soya, et germe de blé. L'hypothèse derrière cette étude est que les sources complexes d'azote organique peuvent agir comme des sources de nutriments lentement assimilables qui permettent de maintenir des conditions limitantes en azote (et en carbone) nécessaires pour que *P. chrysosporium* entre en phase de métabolisme secondaire de production de ligninases, mais aussi pour stimuler le métabolisme

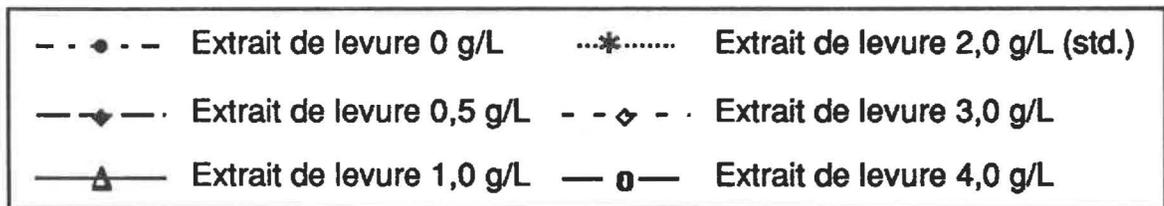
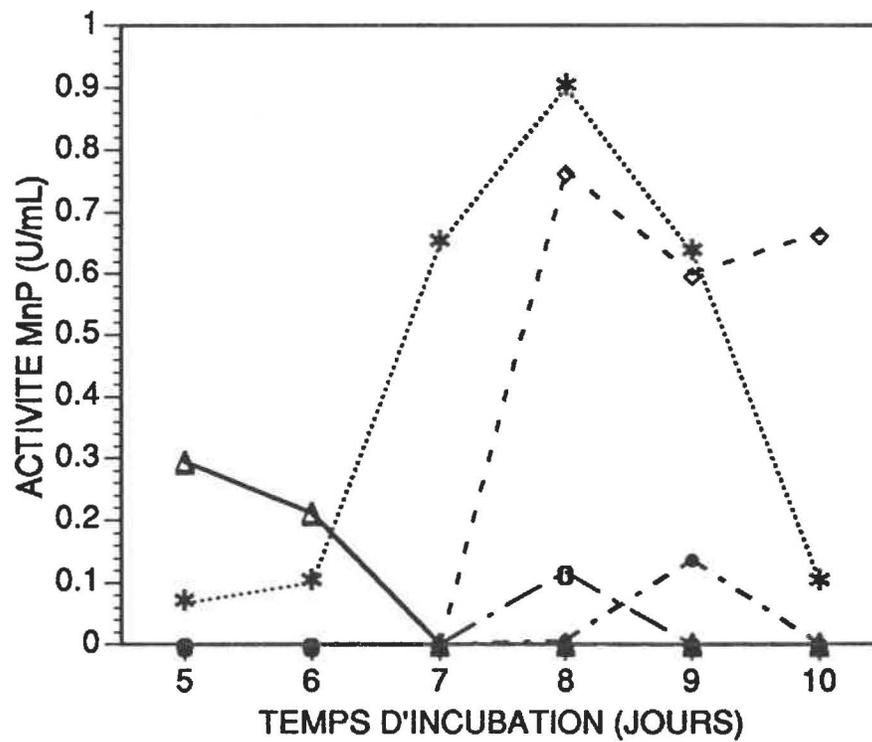
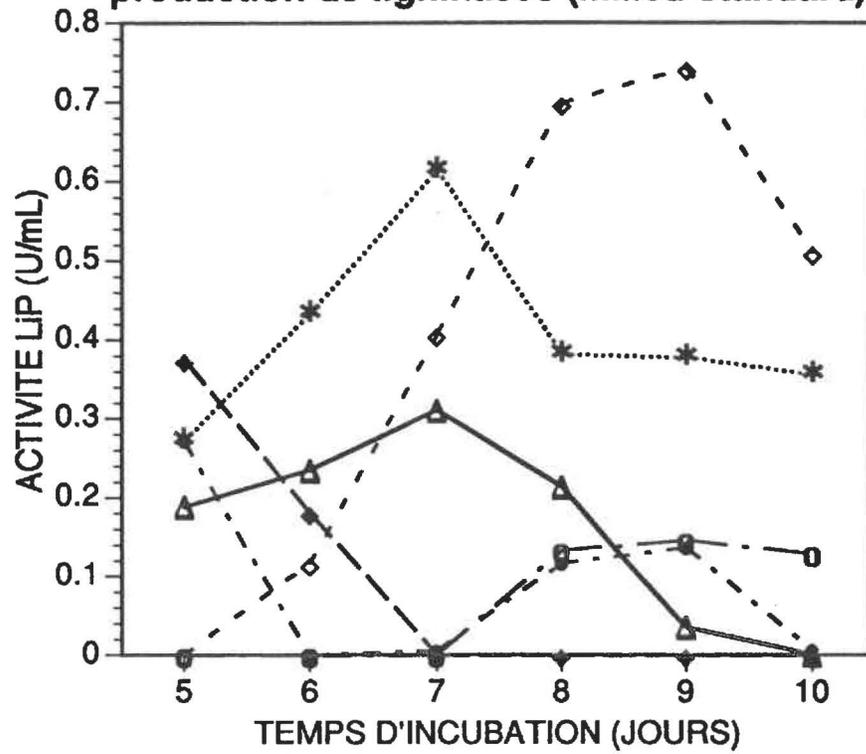
secondaire en fournissant les acides aminés essentiels, et bases azotées, comme sources d'énergie et pour la synthèse protéique.

Dans une première expérience, nous avons étudié l'effet de diverses concentrations de la source d'azote organique la plus communément utilisée en laboratoire: l'extrait de levure (Fig. 20). Les résultats indiquent que des concentrations de 0,3 et 0,2% d'extrait de levure dans le milieu standard ont donné respectivement des niveaux maxima d'activité LiP et MnP. À une concentration de 0,4% d'extrait de levure, une diminution dramatique d'activités ligninases (LiP et MnP) fut observée.

Ces résultats suggèrent qu'une concentration de 0,2 à 0,3% d'extrait de levure est une limite de concentration optimale à utiliser en milieu standard. Une concentration excessive d'extrait de levure pourrait être délétère pour le fungus, dû à la présence excessive de facteurs de croissance (vitamines) et d'acides aminés dans le milieu, qui sont probablement responsables de la suppression du métabolisme secondaire, d'où la diminution d'activités ligninases à une concentration de 0,4%.

Dans une seconde expérience, nous avons étudié l'effet de diverses sources d'azote organique: extrait de levure, extrait de boeuf, soytone (hydrolysat de protéines de soya), protéose peptone (hydrolysat de viande), casamino acids (hydrolysat acide de caséine), farine de soya et germe de blé, dans le milieu standard (sans extrait

Fig.20 : Effet de la concentration d'extrait de levure sur la production de ligninases (milieu standard).



(marge d'erreur= 12,5%)

de levure). Tous ces ingrédients sont de qualité laboratoire, excepté la farine de soya et le germe de blé.

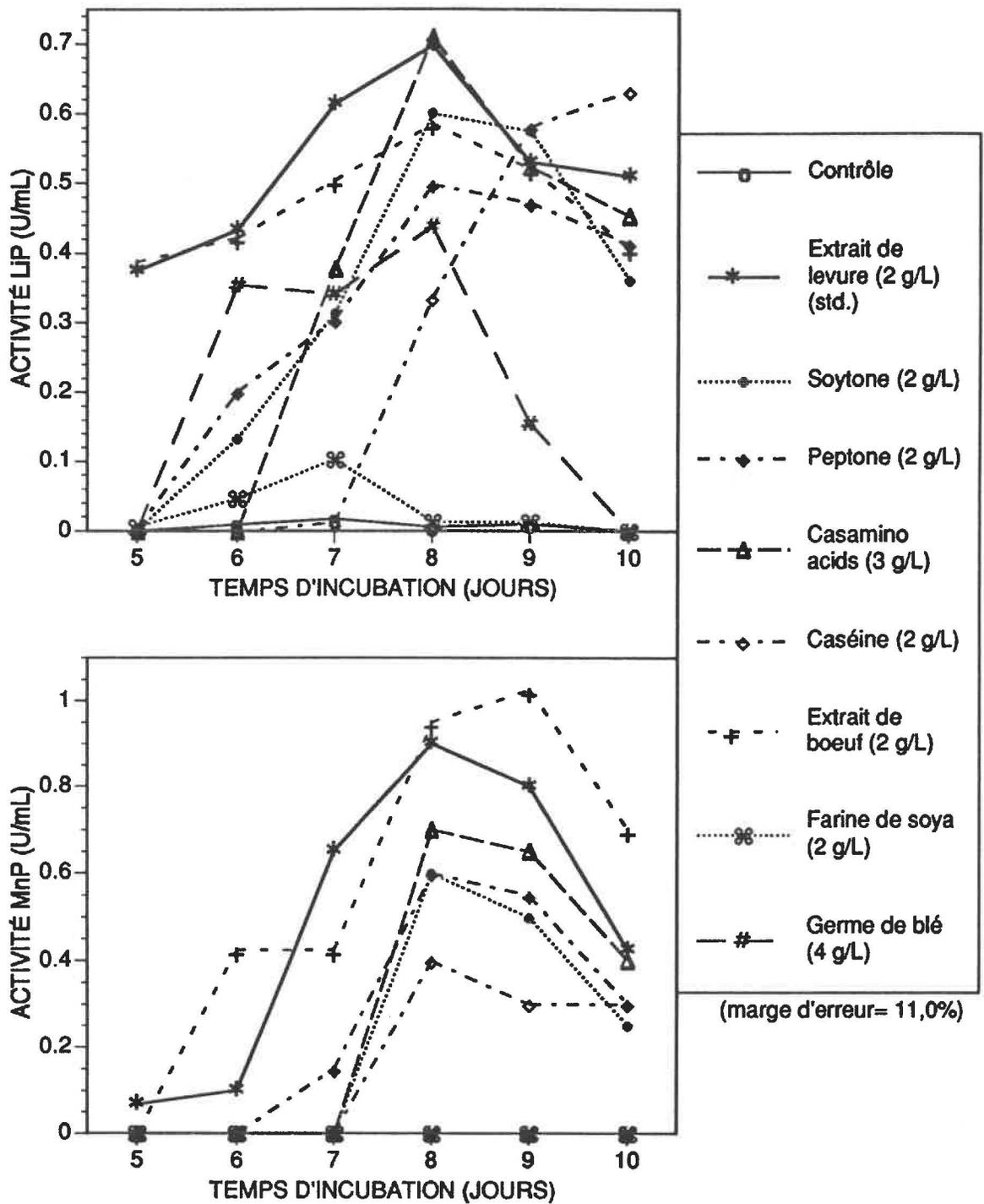
Les résultats (Fig. 21) peuvent être interprétés comme suit, pour chaque source d'azote organique:

Pour la production de LiP, les activités maximales obtenues furent dans l'ordre décroissant suivant: casamino acids >/= extrait de levure > caséine > soytone > extrait de boeuf > peptone > germe de blé > farine de soya > témoin sans source d'azote organique. Les productivités relatives (activités LiP maximales par jour d'incubation) furent dans l'ordre décroissant suivant: casamino acids >/= extrait de levure > soytone > extrait de boeuf > caséine >/= peptone > germe de blé > farine de soya > témoin sans source d'azote.

Pour la production de MnP, les activités maximales furent obtenues dans l'ordre décroissant suivant: extrait de boeuf > extrait de levure > casamino acids > peptone, soytone > caséine. Aucune activité MnP fut obtenue avec la farine de soya, le germe de blé, et le témoin sans source d'azote. Aussi, les productivités relatives (activités MnP maximales par jour d'incubation) sont dans l'ordre décroissant suivant: extrait de levure, extrait de boeuf > casamino acids > soytone, peptone > caséine > germe de blé, farine de soya, et témoin sans source d'azote organique.

Ces résultats indiquent que la meilleure source d'azote organique pour la production des deux types de ligninases est l'extrait de levure. Cependant, le casamino acids semble aussi bon pour la production de

Fig. 21 : Effet de diverses sources d'azote organique (concentrations optimales) sur la production de liginases (milieu standard)



LiP, alors que l'extrait de boeuf donne une meilleure production de MnP. En général, on observe que les extraits (extrait de levure, extrait de boeuf) et le casamino acids sont de bonnes sources s'azote organique pour la production d'activités élevées en ligninases, suivies de près par des hydrolysats (soytone, peptone) et la caséine, permettant d'obtenir des activités légèrement moindres. La principale différence dans la composition de certaines de ces sources est dans la farine de soya contenant de l'amidon, et le germe de blé contenant des fibres de lignocelluloses, ce qui signifie que ces sources peuvent être utilisées comme sources de carbone par le fungus, d'où la suppression de la production de ligninases jusqu'à ce que ces substrats soient épuisés, tel qu'observé par une apparition faible et tardive des l'activités ligninases.

Si nous comparons maintenant le coût des ingrédients, nous aurions l'ordre suivant du coût des ingrédients, à partir du plus dispendieux:

Extrait de boeuf > extrait de levure > peptone > soytone > casamino acids > farine de soya > caséine > germe de blé. Cela signifie que les sources permettant l'obtention des meilleures activités ligninases (les extraits) sont aussi les plus dispendieuses. Néanmoins, même si l'extrait de levure et l'extrait de boeuf sont les sources les plus dispendieuses, l'objectif de cette étude d'optimisation était plutôt orienté sur la mise au point des conditions qui favorisent au maximum la production de ligninases plutôt que sur les aspects économiques de la production (rentabilité).

Donc, on peut conclure que l'extrait de levure est la meilleure source d'azote organique pour la production optimale (maximale) de ligninases. La composition protéique et d'acides aminés des sources d'azote organique (particulièrement les extraits) sont des sources de nutriments lentement assimilables. C'est pourquoi ils n'interfèrent pas avec le métabolisme secondaire, mais le favorisent plutôt, dû à la présence de précurseurs directs pour la synthèse protéique (ligninases). La supplémentation du milieu avec de telles sources pourrait aussi avoir un rôle protecteur sur les ligninases. Il a déjà été rapporté (Bonnarme et Jeffries, 1992) que l'entrée en phase de métabolisme secondaire par *P. chrysosporium* est accompagnée par une production de protéases fongiques (et d'autocatabolisme) lorsque les sources de carbone et d'azote sont épuisées. Donc, en supplémentant le milieu avec certaines sources d'azote organique, la production de protéases pourrait être réprimée et les protéines (de la source d'azote) en suspension dans le milieu pourraient agir comme molécules-bouclier entourant et protégeant les ligninases des risques de protéolyse.

2.12. Effet de différentes concentrations d'azote inorganique (diammonium tartrate) sur la production de ligninases (milieu standard, [glucose] variable, avec ou sans extrait de levure):

Dans cette expérience, nous avons étudié l'effet de diverses combinaisons et concentrations de la source d'azote inorganique

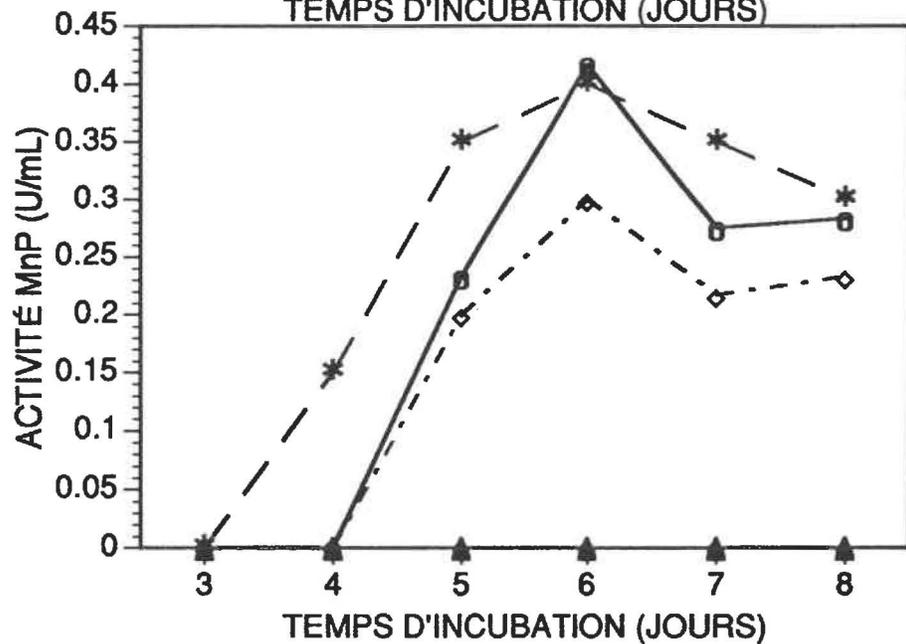
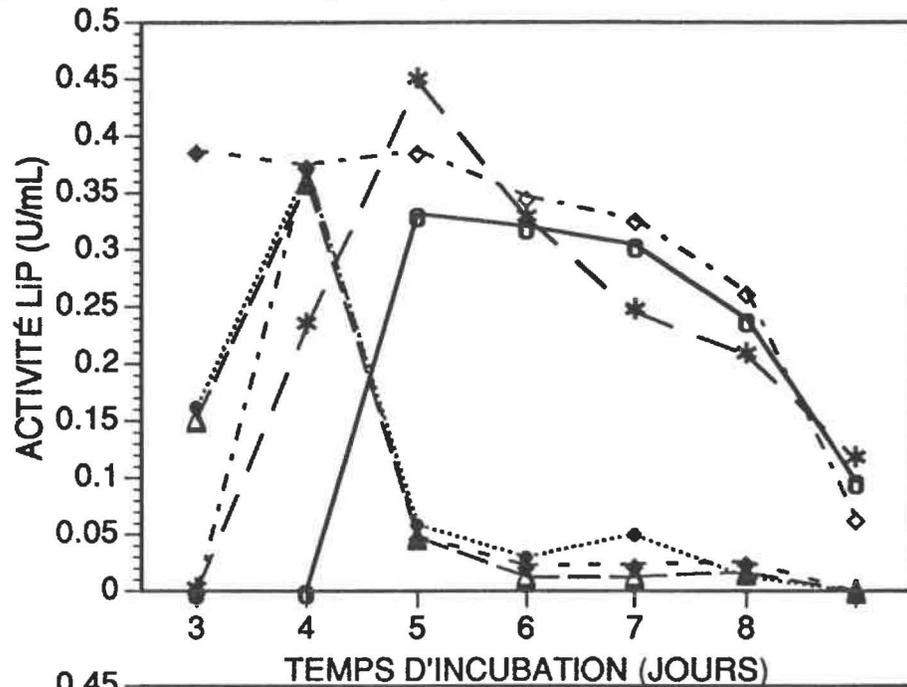
(diammonium tartrate) et de la source de carbone (glucose), avec ou sans la source d'azote organique (extrait de levure), come suit:

- i) Milieu standard, +/- extrait de levure, 0% glucose (Fig. 22);
- ii) Milieu standard, +/- extrait de levure, 0,5% glucose (Fig. 23),
où l'effet de diverses concentrations de diammonium tartrate (0,20 et 0,66 et 1,00 g/L) en présence ou en absence de 2 g/L d'extrait de levure furent comparés afin de déterminer la combinaison optimale entre ces trois composantes nutritionnelles pour la production de ligninases.

Nous avons observé que toutes les concentrations de diammonium tartrate utilisées ont été à peu près aussi bonnes pour la production des ligninases lorsque l'extrait de levure fut ajouté dans le milieu avec ou sans 0,5% de glucose. Ce fut aussi le cas pour la production de LiP lorsque l'extrait de levure était absent dans le milieu sans glucose. Ces observations indiquent que dans des conditions limitantes ou peu élevées en glucose (0% et 0,5%), l'effet des concentrations étudiées en azote libre dans le milieu affecte peu la production de ligninases. Cependant, 0,20 g/L de diammonium tartrate avec extrait de levure semble être une combinaison optimale pour la production des deux types de ligninases en absence ou présence de 0,5% glucose.

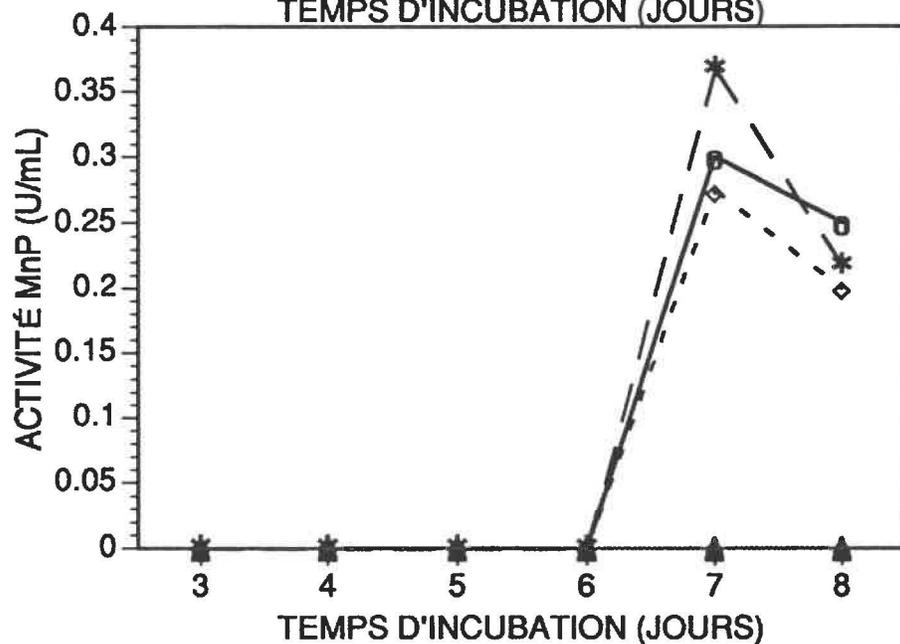
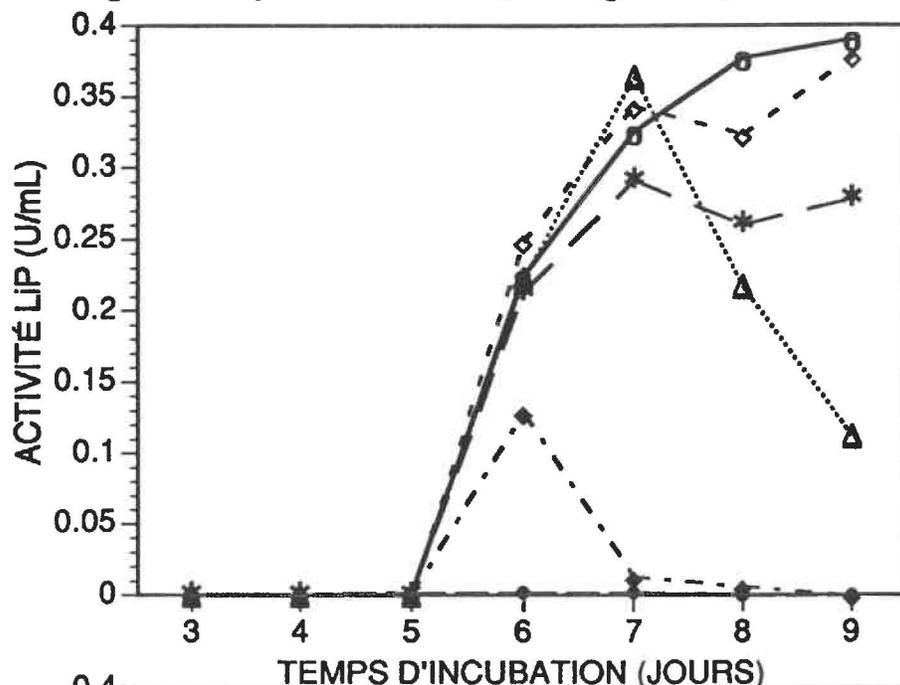
Seulement en présence d'extrait de levure, l'activité MnP fut observée, et elle fut un peu plus élevée en absence de glucose (Fig.

Fig. 22 : Effet de la concentration en azote Inorganique (diammonium tartrate) et de l'extrait de levure (2 g/L) sur la production de ligninases (milieu standard, 0% glucose).



(marge d'erreur= 14,9%)

Fig. 23 : Effet de la concentration en azote inorganique (diammonium tartrate) et de l'extrait de levure (2 g/L) sur la production de ligninases (milieu standard, 0.5% glucose).



- ◆ — 0,20 g/L (NH₄)₂ tartrate, sans Extrait de levure.
- - ◆ - - 0,66 g/L (NH₄)₂ tartrate, sans Extrait de levure.
-▲..... 1,00 g/L (NH₄)₂ tartrate, sans Extrait de levure.
- * — 0,20 g/L (NH₄)₂ tartrate, avec Extrait de levure (std.).
- - ◇ - - 0,66 g/L (NH₄)₂ tartrate, avec Extrait de levure.
- ○ — 1,00 g/L (NH₄)₂ tartrate, avec Extrait de levure.

(marge d'erreur= 14,4%)

22). De plus, les activités LiP sont maintenues plus longtemps en présence d'extrait de levure lorsqu'il n'y a pas de glucose ajouté, suggérant que l'extrait de levure permet un support de viabilité du fungus et pourrait avoir un rôle protecteur sur la stabilité ou encore contre la protéolyse des ligninases dans des conditions limitantes en carbone.

En présence de glucose (0,5%), on observe que l'apparition d'activité ligninase fut retardée dû à une période prolongée de métabolisme primaire, jusqu'à épuisement du glucose. L'activité MnP est apparue très tardivement (7 jours) et ensuite, un déclin abrupte de l'activité MnP s'ensuit, avec le milieu glucosé à 0,5% (Fig. 23).

Nous pouvons donc conclure de ces résultats qu'à partir du milieu standard avec 0,5% glucose, des conditions plus limitantes en carbone (0% glucose) permettent d'obtenir des activités ligninases comparables avec l'avantage d'une plus grande rapidité de la production (productivité), ainsi qu'une moins grande demande en azote inorganique et/ou organique pour l'obtention de niveaux comparables ou supérieurs de production de ligninases, ce qui est plus avantageux pour en vue d'une production optimale de ligninases.

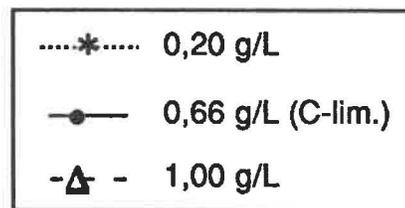
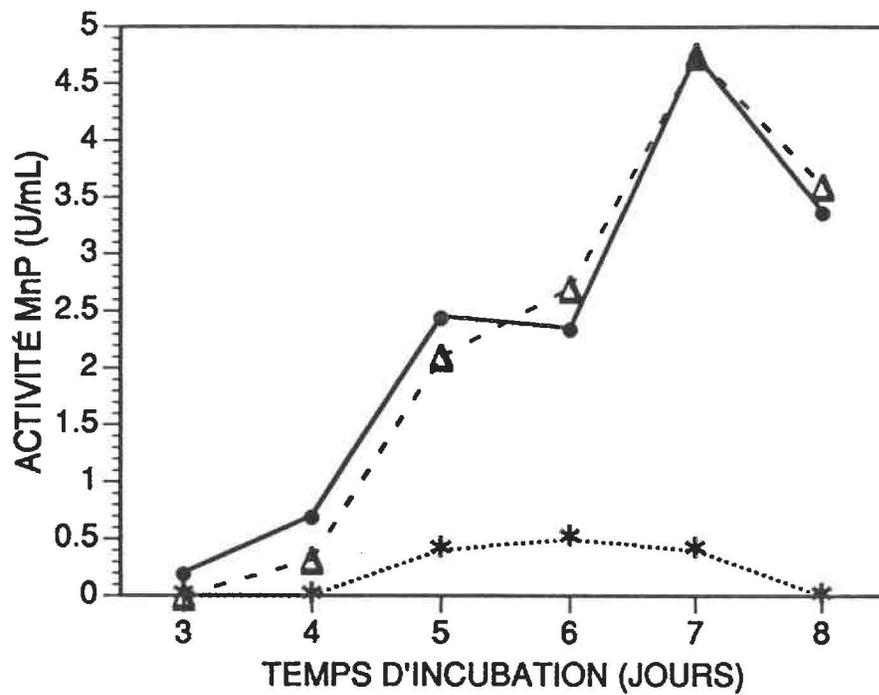
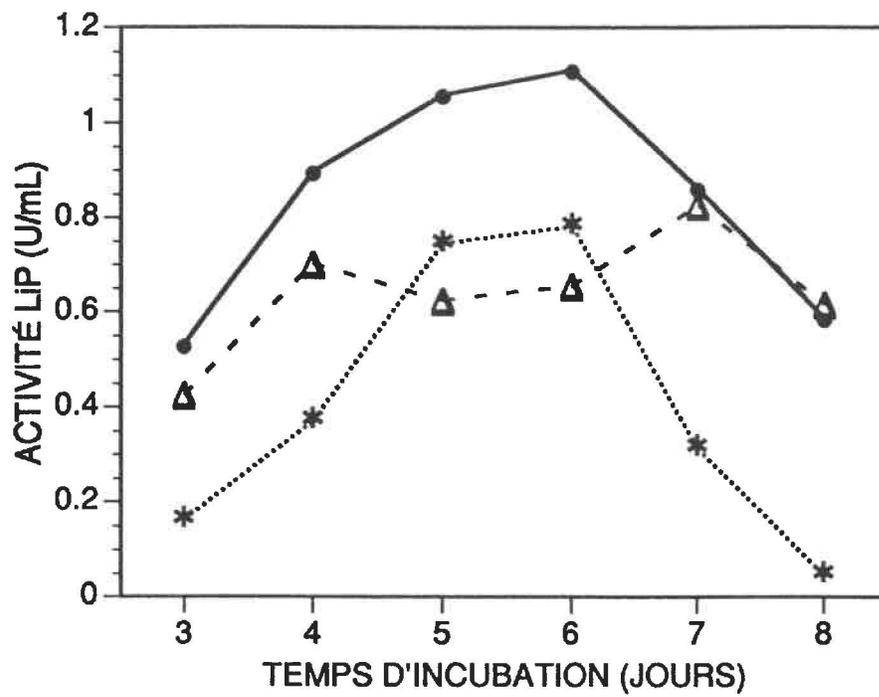
2.13. Effet de la concentration de diammonium tartrate sur la production de ligninases (milieu C-limitant, [Mn]= 40 ppm):

Les résultats présentés en figure 24 montrent l'effet de diverses concentrations de diammonium tartrate sur la production de ligninases avec le milieu C-limitant contenant 40 ppm de Mn^{2+} . Les activités LiP obtenues ici furent 2 fois supérieures à celles obtenues en figure 22 sous des conditions à peu près similaires (i.e. milieu standard sans glucose) pour toutes les concentrations de diammonium tartrate. De plus, les activités MnP ont augmenté d'environ 10 fois avec 0,66 et 1,00 g/L de diammonium tartrate, comparativement à celles obtenues sous des conditions similaires avec seulement 11,1 ppm Mn^{2+} (Fig. 22). Donc, nous pouvons conclure dans cette expérience que le niveau optimal de diammonium tartrate en milieu C-limitant avec 40 ppm de Mn^{2+} est de 0,66 g/L.

2.14. Effet de l'eau de robinet et des éléments de trace sur la production de ligninases (milieu standard):

Il a été établi par Kirk et al. (1988) qu'un excès de six fois (6×10 mL) la quantité basale (10 mL) d'une solution d'éléments de trace de Kirk par litre de milieu doit être utilisé pour obtenir une augmentation significative de la production de ligninases. Dans une étude de production à grande échelle de ligninases, Janshekar et Fiechter (1988)

Fig. 24 : Effet de la concentration de diammonium tartrate sur la production de ligninases (milieu C-limitant, [Mn] = 40 ppm).

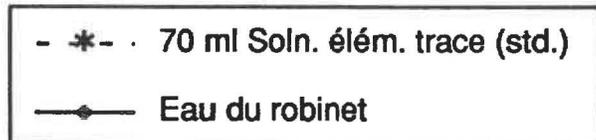
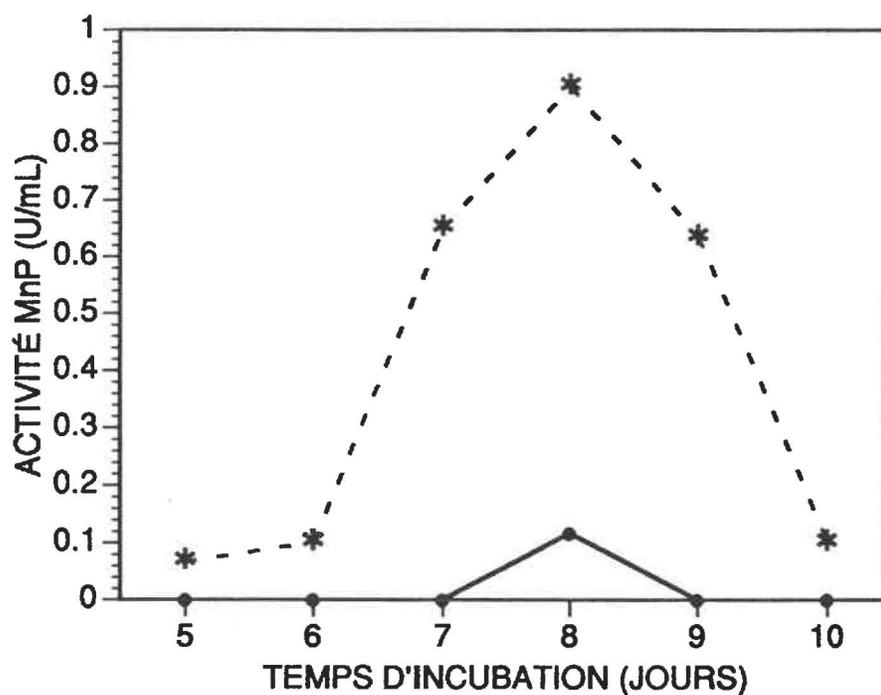
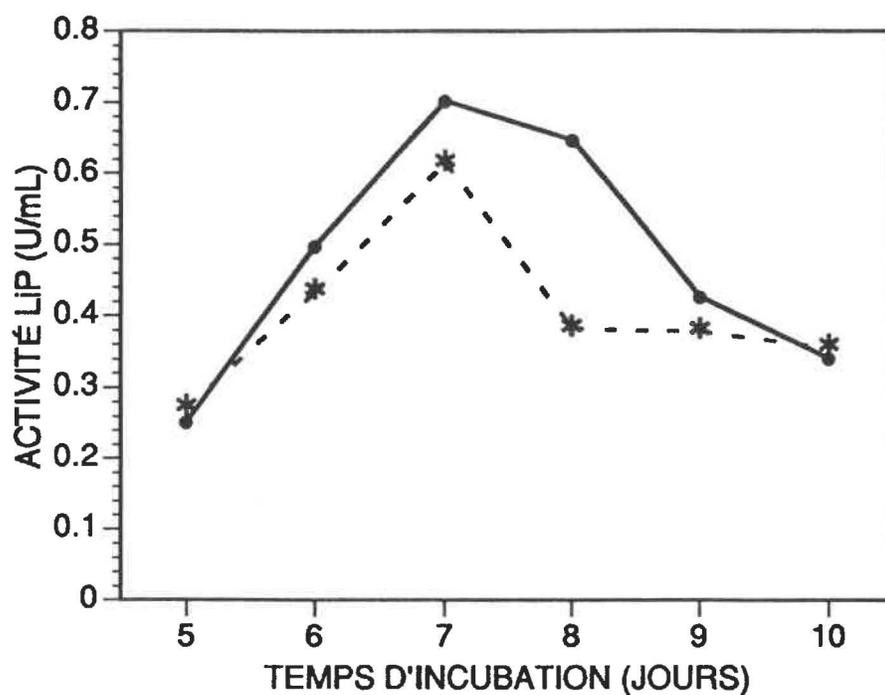


(marge d'erreur= 11,1%)

ont rapporté des rendements élevés de ligninases en utilisant l'eau de robinet comme source d'éléments de trace. Dans cette expérience, nous avons voulu déterminer si l'utilisation de notre eau de robinet comme source de minéraux peut remplacer les besoins nutritionnels fournis par la solution d'éléments de trace de Kirk pour la production de ligninases (Fig. 25).

Les résultats ont indiqué que la substitution de la solution d'éléments de trace (70 mL de solution d'éléments de trace de Kirk) par l'eau de robinet dans le milieu standard a permis d'obtenir des activités LiP légèrement supérieures, mais les niveaux d'activité MnP sont demeurés faibles. Les faibles activités MnP peuvent être explicables par une concentration plus faible en ions Mn^{2+} dans l'eau de robinet. Les résultats suggèrent que l'utilisation de l'eau de robinet peut être une alternative intéressante pour remplacer la solution définie d'éléments de trace, pourvu que celle-ci soit supplémentée en Mn^{2+} pour optimiser la production de MnP. Cependant, ne connaissant pas la composition des minéraux dans notre eau de robinet, nous avons plutôt opté pour l'utilisation de la solution définie d'éléments de trace.

Fig. 25 : Effet de l'eau du robinet comme source d'éléments de trace pour la production de ligninases (milieu standard).



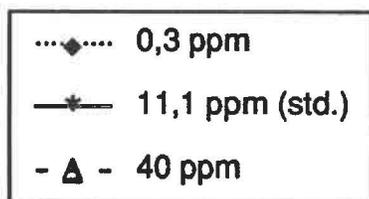
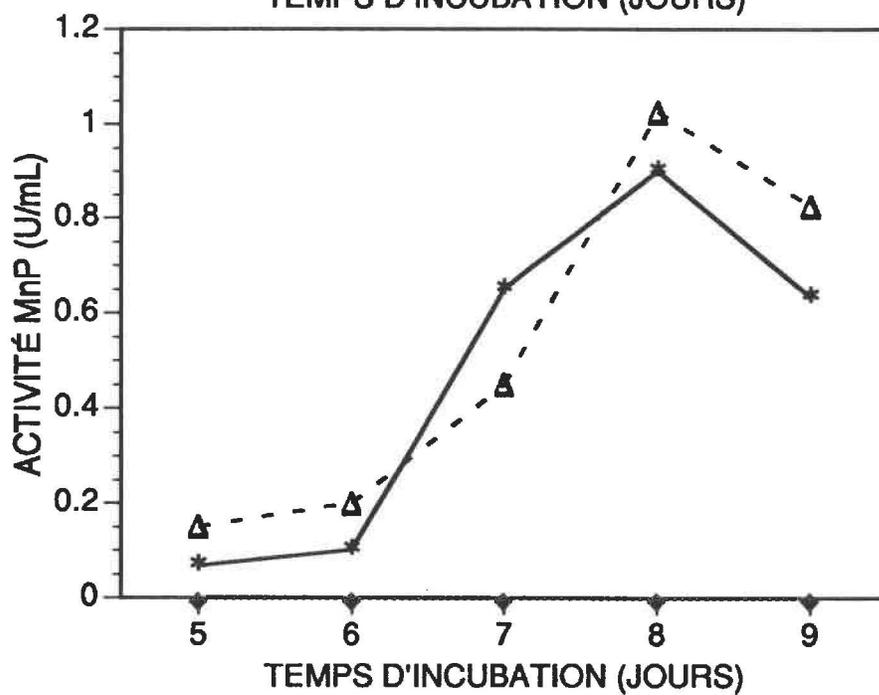
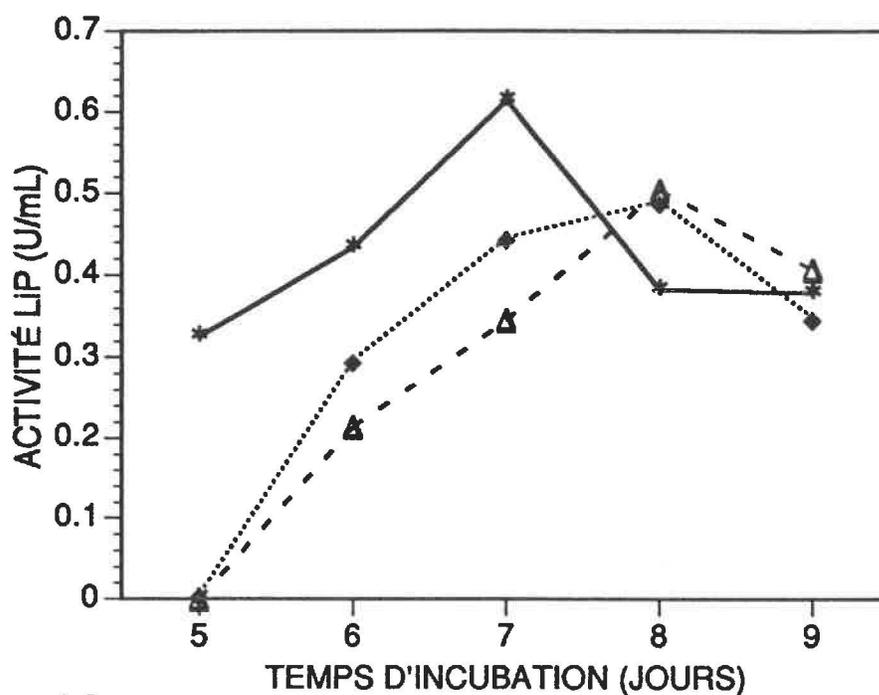
(marge d'erreur= 14,2%)

2.15. Effet de différentes concentrations en ion manganèse (Mn^{2+}) sur la production de ligninases (milieu standard et C-limitant):

L'effet de la concentration de l'ion manganèse sur la production de ligninases est bien documenté (Kirk et al., 1985; Bonnarne et Jeffries, 1990; Perez et Jeffries, 1992). Il est bien établi qu'une concentration élevée de manganèse (40 ppm) dans le milieu a un effet stimulateur (inducteur) pour l'activité MnP, mais inhibiteur (répresseur) pour la production d'activité LiP. Inversement, à une concentration faible (0,3 ppm), la production de MnP est inhibée, et l'activité LiP est alors dé-réprimée. Il a aussi été établi que le niveau de Mn^{2+} pour la production optimale d'activité MnP est 40 ppm et 0,3 à 11,1 ppm dans le cas de LiP. Dans cette expérience, nous avons étudié l'effet de concentrations faibles (0,3 ppm), normales (11,1 ppm) et élevées (40 ppm) en ion Mn^{2+} en milieu standard (Fig. 26) ainsi qu'en milieu C-limitant (Fig. 27).

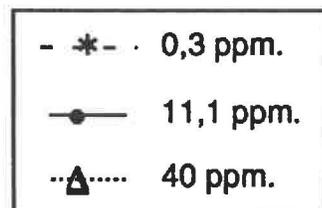
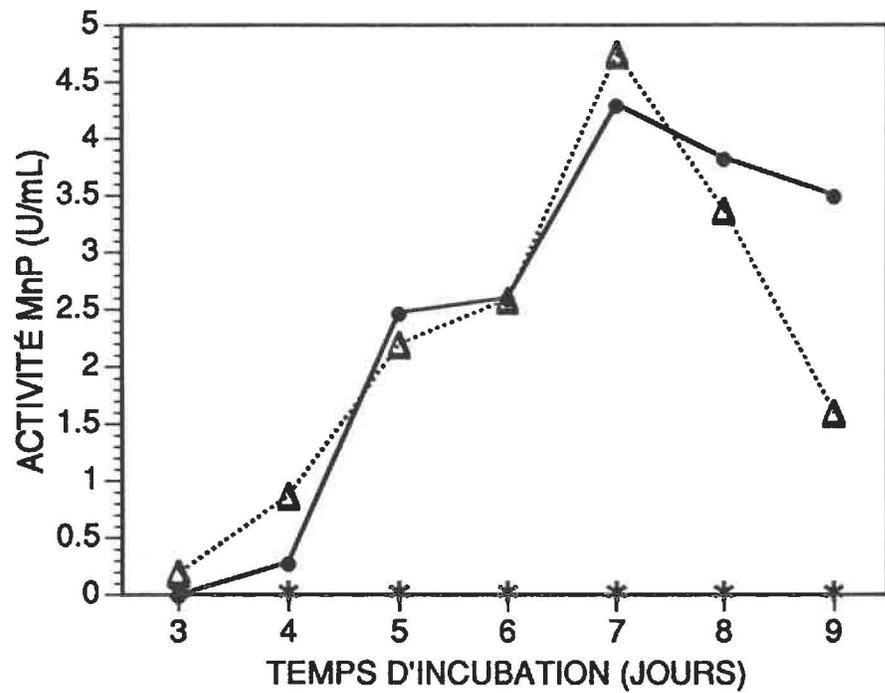
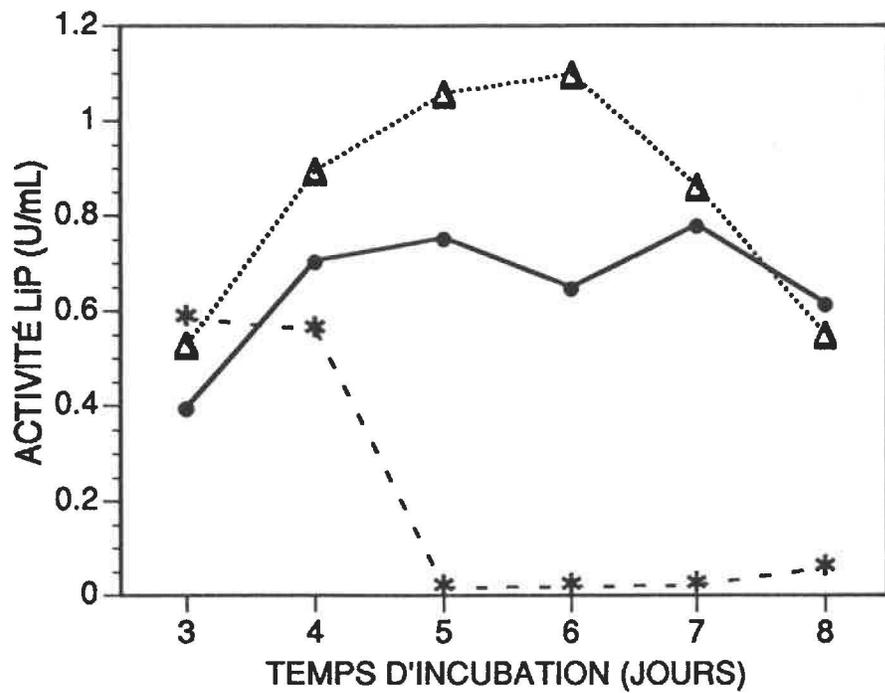
En milieu standard, les résultats indiquent que 40 ppm de Mn^{2+} ont permis de produire des activités MnP légèrement supérieures à celles obtenues à 11,1 ppm. Cependant, à 0,3 ppm, aucune activité MnP fut observée. L'activité LiP fut maximale à 11,1 ppm Mn^{2+} , et légèrement plus faible à 0,3 et 40 ppm (Fig. 26).

Fig. 26: Effet de la concentration de l'ion manganèse sur la production de ligninases (milieu standard).



(marge d'erreur= 11,0%)

Fig. 27 : Effet de la concentration de l'ion manganèse sur la production de ligninases (milieu C-limitant).



(marge d'erreur= 13,2%)

En milieu C-limitant, les résultats ont indiqué que 40 ppm de Mn^{2+} permettent de produire des niveaux maximaux de LiP et MnP. À 11,1 ppm, la production de LiP fut diminuée, mais celle de MnP est demeurée presque inchangée. Finalement, à 0,3 ppm, aucune activité détectable de MnP n'a eu lieu, et l'activité LiP fut diminuée de façon significative (Fig. 27).

Ces résultats supportent l'effet positif déjà établi de Mn^{2+} sur la production de MnP. Cependant, ces résultats sont entièrement contradictoires avec l'effet répressif établi à concentration élevée en Mn^{2+} . La nature très différente du milieu utilisé ici (présence de copeaux de bois, extrait de levure, et PEG 6000) comparativement aux milieux rapportés pour l'étude de l'effet de la concentration de Mn^{2+} peut être responsable de ces résultats imprévus. Mais la raison exacte n'est pas claire. Cependant, nous pouvons conclure de ces résultats qu'en milieu standard, une concentration de 11,1 ppm de Mn^{2+} peut permettre une production optimale de LiP, et en milieu C-limitant, 40 ppm de Mn^{2+} peut permettre une production optimale de LiP et MnP.

2.16. Effet de différentes concentrations en alcool vératrylique sur la production de ligninases (milieu standard et C-limitant):

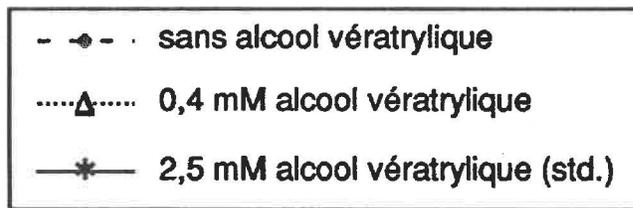
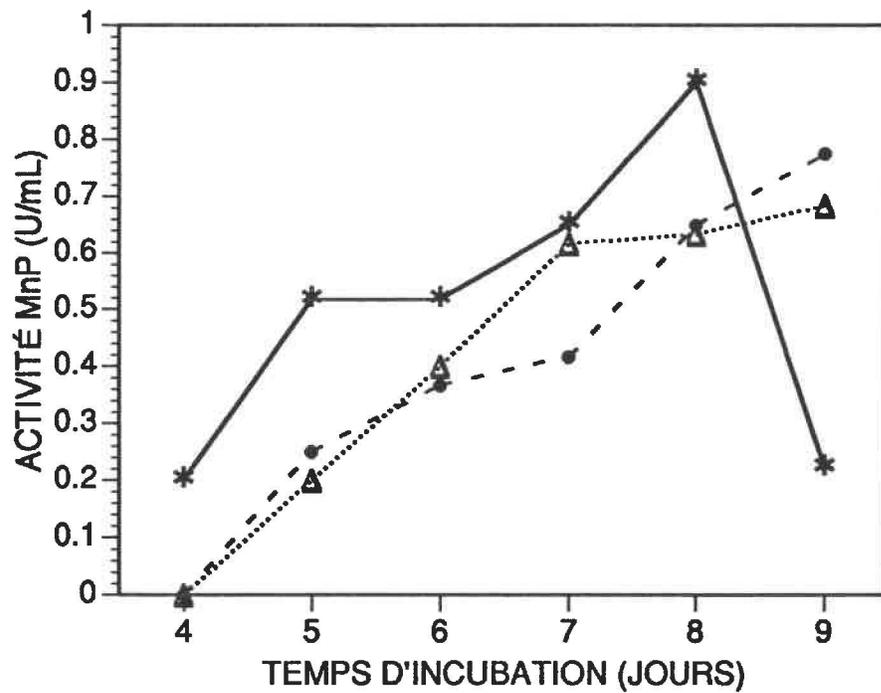
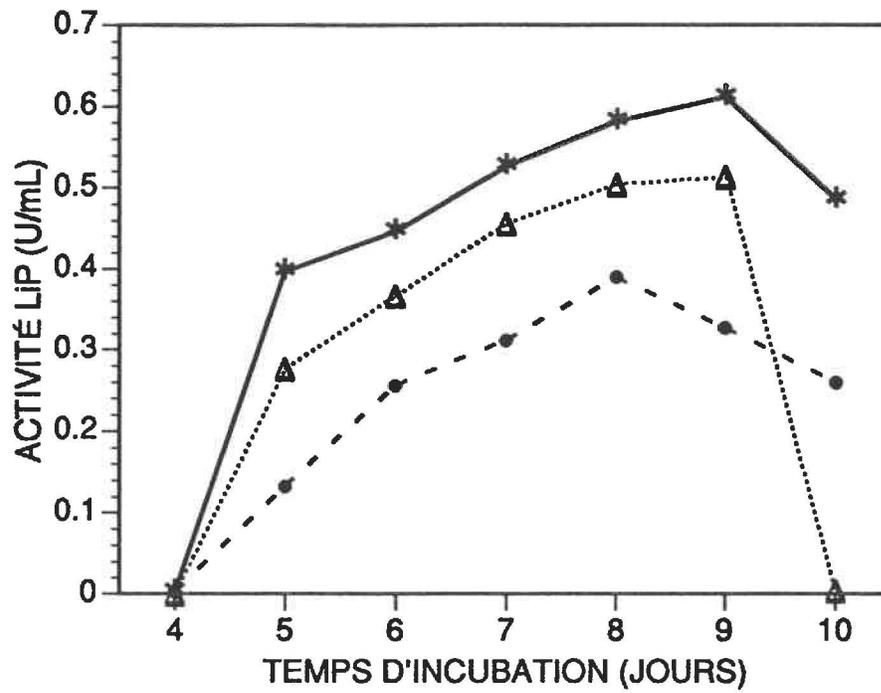
L'alcool vératrylique est un monomère dérivé de la lignine et aussi un métabolite secondaire naturel de *P. chrysosporium*, et est communément utilisé comme inducteur dans la majorité des milieux

rapportés pour la production de ligninases avec *P. chrysosporium*. Il a été établi que l'alcool vératrylique est impliqué non seulement dans l'induction de la production de ligninases, mais aussi dans la biodégradation de la lignine, et dans la stabilité catalytique des ligninases. Une concentration de 2,5 mM de ce composé a été utilisée dans la plupart des milieux rapportés (Bonarme et Jeffries, 1990) pour les études de production de ligninases. Leisola et al. (1985) a déterminé que 1-2 mM d'alcool vératrylique est le niveau optimal de concentrations.

Dans cette expérience, nous avons étudié l'effet de diverses concentrations d'alcool vératrylique sur la production de ligninases en milieu standard (Fig. 28). Les résultats ont révélé que dans ce milieu, les niveaux maximaux des deux types de ligninases furent obtenus avec 2,5 mM d'alcool vératrylique. Même en absence de cet inducteur, des niveaux significatifs de ligninases furent produits. En milieu standard, nous avons observé une relation parallèle entre les profils d'activité LiP obtenus aux différentes concentrations d'inducteur étudiées. Cependant, les profils de production de MnP furent presque identiques à 0 et 0,4 mM d'inducteur.

Ces résultats montrent que la production de LiP est plus affectée par la concentration d'alcool vératrylique que MnP. Aussi, les activités ligninase significatives observées en absence d'inducteur en milieu standard démontrent que cet additif n'est pas essentiel pour la

Fig. 28 : Effet de la concentration en alcool vératrylique sur la production de ligninases (milieu standard).



(marge d'erreur= 9,4%)

production de ligninases dans un tel milieu, probablement à cause d'une production intrinsèque de ce métabolite secondaire par le fungus.

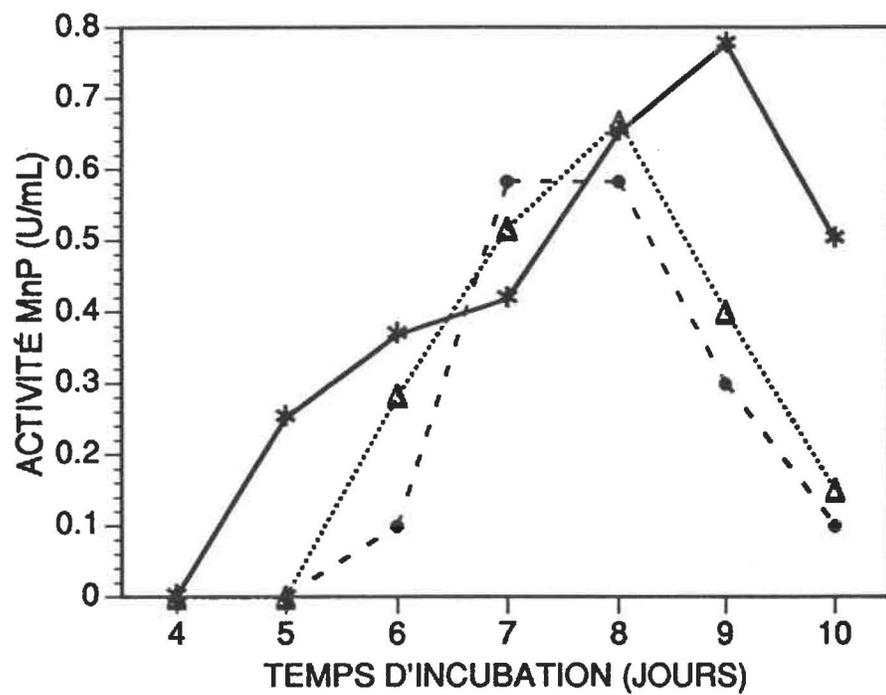
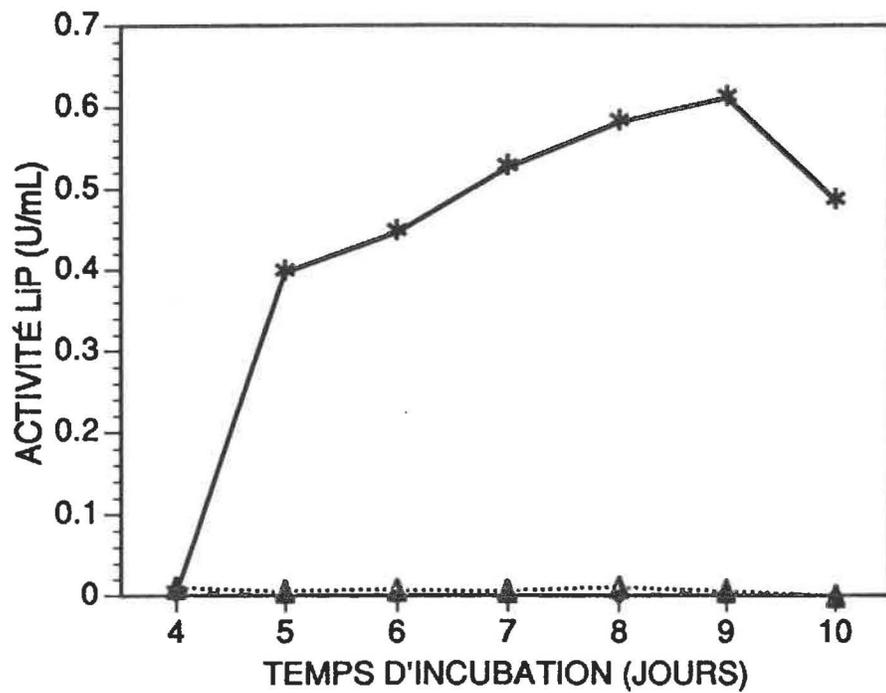
On peut donc conclure de ces résultats qu'une concentration de 2,5 mM d'alcool vératrylique semble être optimale pour la production des deux types de ligninases en milieu standard.

2.17. Effet de diverses préparations de lignines commerciales sur la production de ligninases (milieu standard):

Le but de cette expérience (Fig. 29) fut d'observer s'il est aussi possible d'augmenter (induire) la production de ligninases en remplaçant l'alcool vératrylique par des préparations de lignines commerciales (lignosol) qui sont beaucoup moins dispendieuses que l'alcool vératrylique. Ces préparations peuvent contenir des mélanges utiles de certains dilignols ou oligolignols pouvant potentiellement induire la production de ligninases.

Les résultats indiquent que la supplémentation de milieu avec lignosol (sous forme solide ou liquide) a supprimé la production de LiP. Cependant, le lignosol diminue légèrement la production de MnP vs. 2,5 mM d'alcool vératrylique. Deux raisons majeures peuvent expliquer pourquoi la production de LiP n'a pas eu lieu en présence de

Fig. 29 : Effet de l'addition de lignine (lignosol) sur la production de ligninases (milieu standard).



- ● - - Lignosol solide (0,1%) (p/v)
 ▲ Lignosol liquide (0,1%) (v/v)
 — * — 2,5% Alcool vératrylique (std.)
 (marge d'erreur= 11,2%)

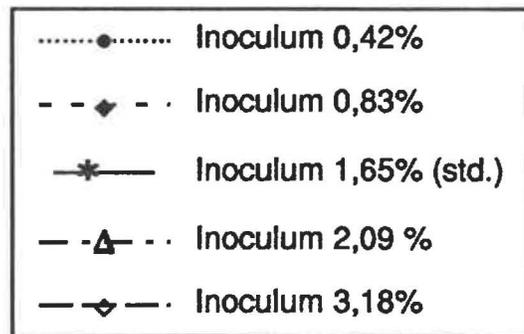
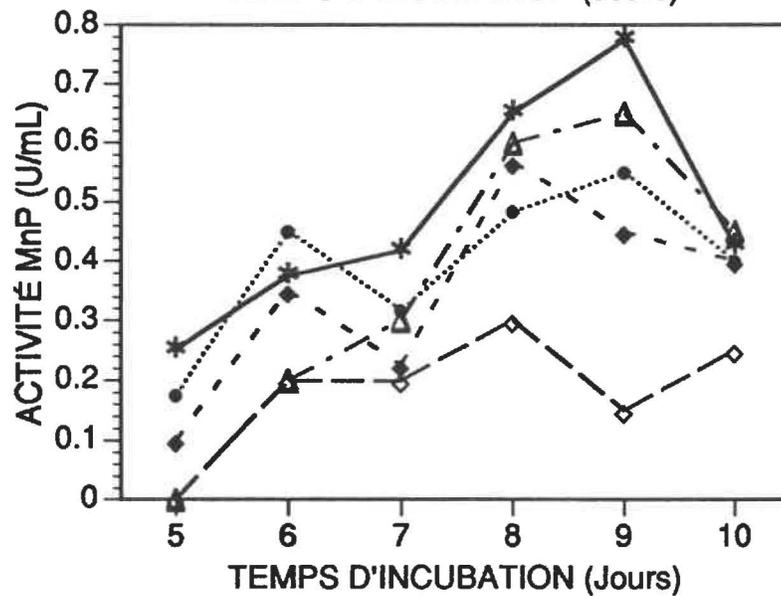
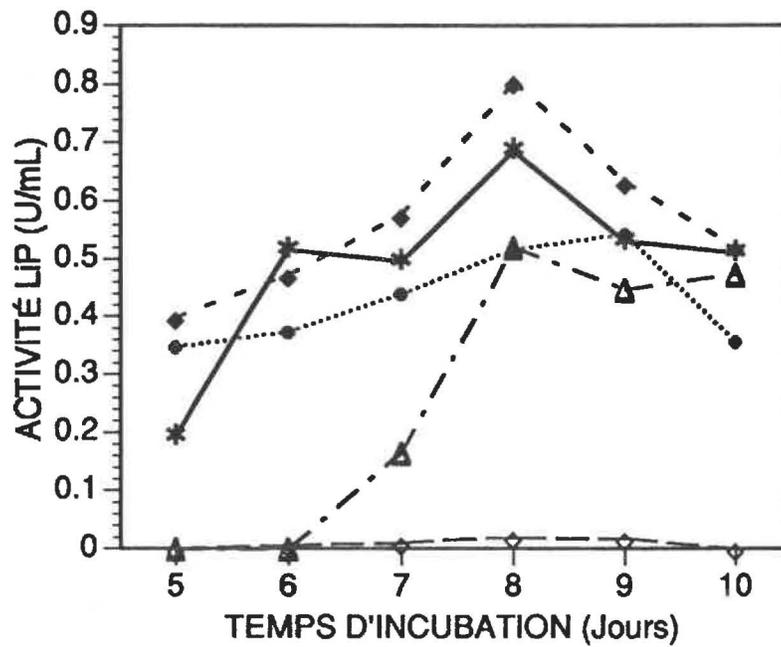
lignosol: d'abord, la composition exacte du lignosol n'est pas définie, et il est possible que certains composés qui y sont présents peuvent être inhibiteurs ou répresseurs de LiP. Ensuite, la coloration brune obtenue dans le milieu lorsque les lignosols furent utilisés aurait pu interférer dans l'essai de LiP, parce que celui-ci est effectué à une longueur d'onde de la région ultra-violet du spectre (310 nm), alors qu'aucun effet de cette coloration ne fut observé pour l'essai de MnP.

2.18. Effet de diverses formes et diverses concentrations d'inoculum sur la production de ligninases (milieu standard et C-limitant):

Dans les études antérieures de production de ligninases avec *P. chrysosporium*, diverses concentrations et de types d'inoculum (conidiospores, broyats mycéliaux et pelotes mycéliales) furent utilisés. Nous considérons que les conditions d'inoculum peuvent être d'importants paramètres pouvant affecter le coût du procédé et la production de ligninases.

L'inoculum mycéliel fut utilisé à une concentration de poids sec moyen de 1,65% (p/v), et fut ajouté dans le milieu, formant 10% (v/v) du milieu liquide. Avec le type d'inoculum sous forme de broyat mycéliel en milieu standard (Fig. 30), des niveaux maximaux d'activité LiP furent obtenus à des concentrations de poids sec de 0,83% (p/v) et 1,65% (p/v) (conc. std.), alors que pour l'activité MnP, ce fut à 1,63% (p/v) et 2,09 (p/v). Cependant, à la concentration la plus élevée en

Fig. 30 : Effet de la concentration (%p/v poids sec) d'inoculum mycéliel (broyat) (milieu standard).



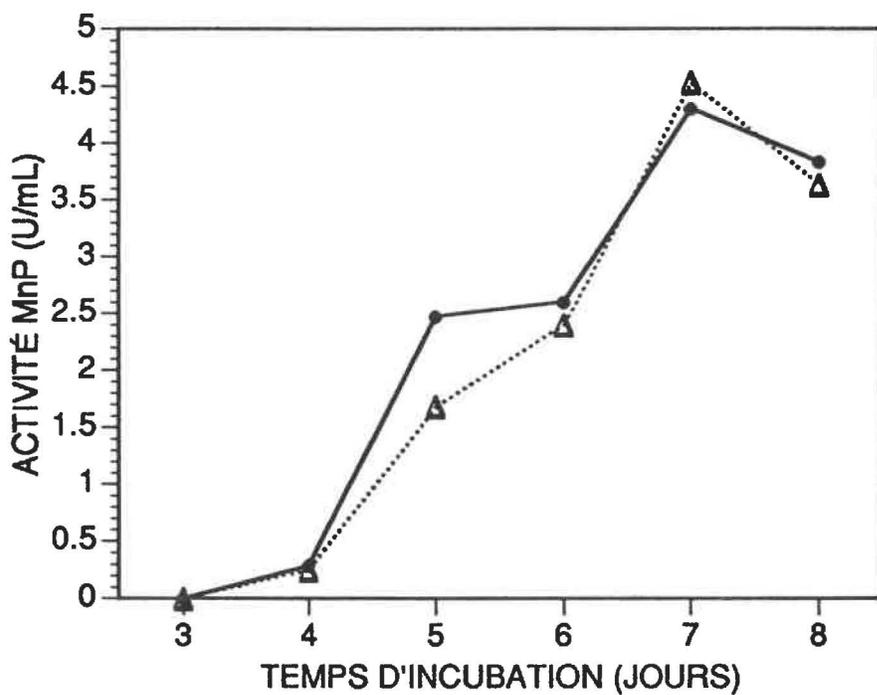
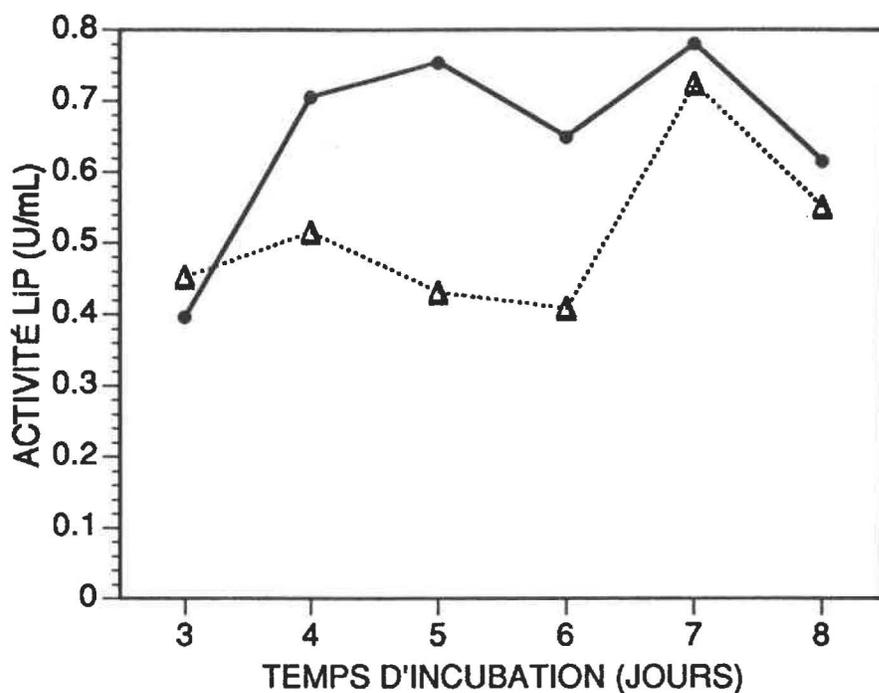
(marge d'erreur= 10,3%)

inoculum (3,18%) (p/v), une diminution significative d'activités ligninases (LiP et MnP) fut obtenue. La quantité excessive de biomasse mycéliale provenant de l'inoculum aurait pu servir de source nutritionnelle riche en carbone et azote, ce qui aurait supprimé le métabolisme secondaire de production de ligninases. Donc 10% (v/v) du milieu constitué d'inoculum de broyat mycéliel à des concentrations (en % poids sec) de 0,83% à 1,65% serait un domaine de concentrations optimales pour la production de ligninases.

Pour le milieu C-limitant (Fig. 31), une concentration d'inoculum sous forme de broyat mycéliel de poids sec de 0,85% (p/v) et 1,65% (p/v) (concentration std.) n'a pas affecté la production de MnP. Cependant, la production de LiP est légèrement plus élevée à la concentration d'inoculum de 1,65% (p/v). Donc, ces résultats suggèrent que le milieu carbone-limitant nécessite une plus grande quantité d'inoculum pour une production optimale et comparable de ligninases LiP. Cependant, à des concentrations comparables d'inoculum, le milieu C-limitant permet de produire des activités MnP beaucoup supérieures au milieu standard.

Le type d'inoculum sous forme de spores (Fig. 32), fut aussi utilisé à raison de 10% (v/v) du milieu, à différentes concentrations (exprimées en nombre final de spores/L milieu). Les résultats ont montré qu'une concentration maximale de $4,8 \times 10^8$ spores/L de milieu a permis d'obtenir un maximum d'activités ligninases (LiP et MnP) qu'aux autres concentrations de spores utilisées.

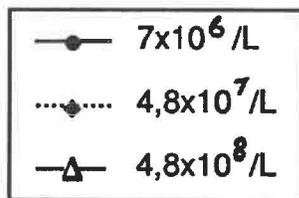
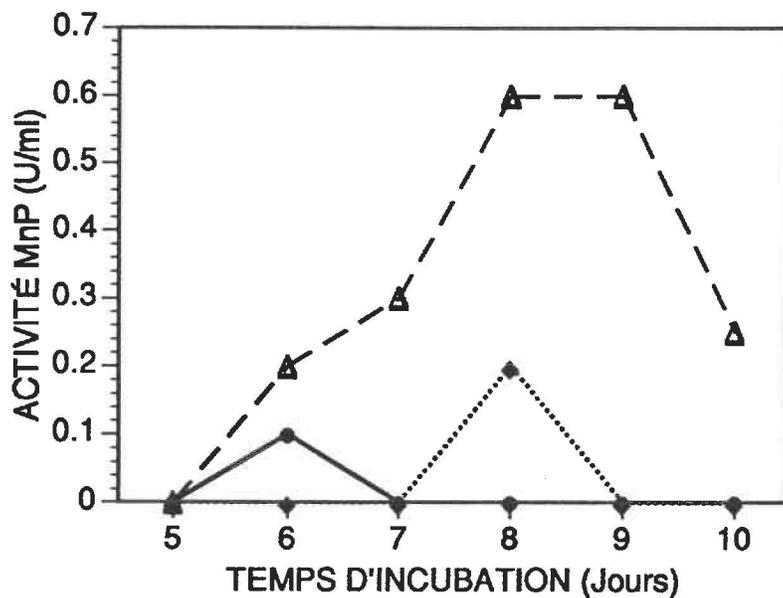
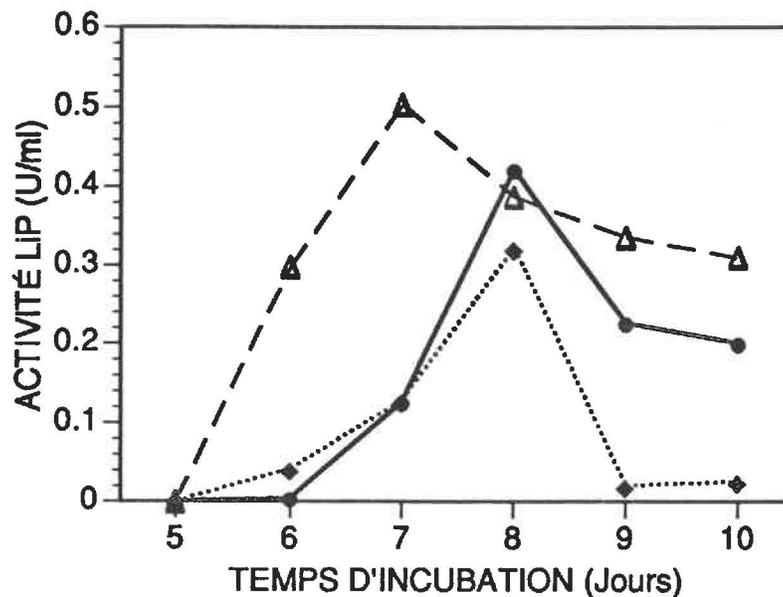
Fig. 31 : Effet de la concentration (% p/v poids sec) d'inoculum mycéliel (broyat) sur la production de ligninases (milieu C-limitant).



—●— Inoculum (1,65%) (C-lim.)
...△... Inoculum (0,83%)

(marge d'erreur= 11,0%)

Fig. 32 : Effet de la concentration (nombre de spores/litre de milieu) d'inoculum de spores sur la production de ligninases (milieu standard).

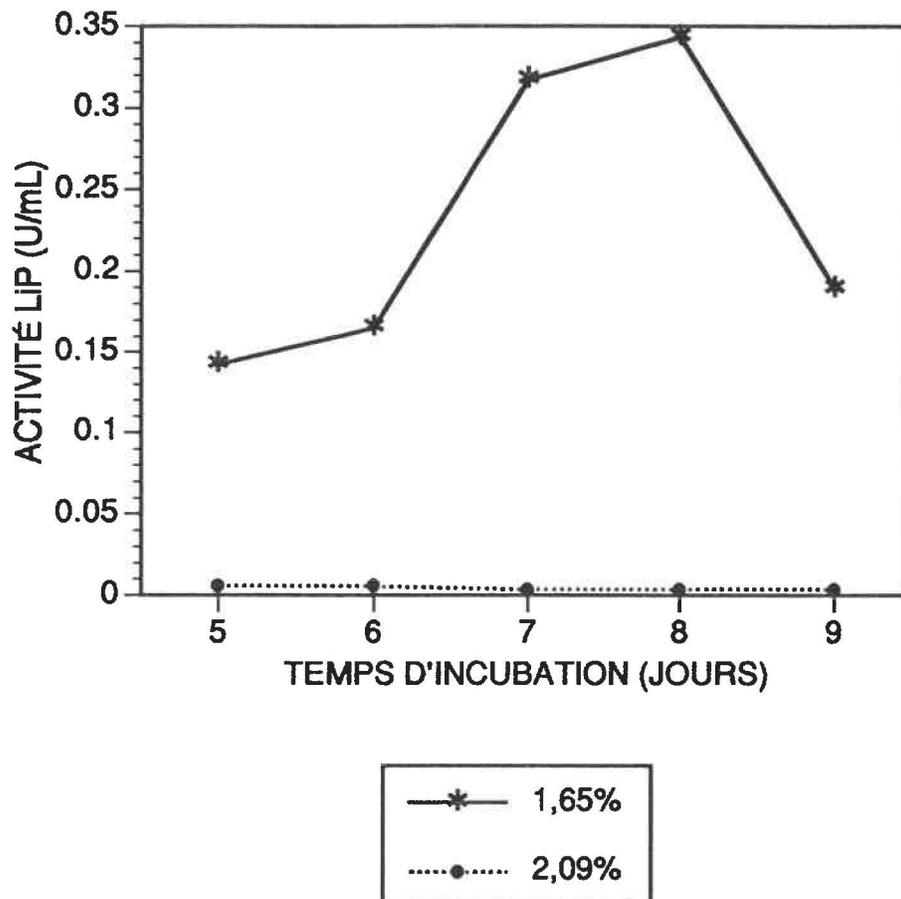


(marge d'erreur= 12,3%)

Il a déjà été rapporté qu'une concentration de 7×10^7 spores/L de milieu pouvait donner des activités ligninases maximales (dans une production à grande échelle) par Janshekar et Fiechter (1988). Des activités maximales de ligninases ont aussi été rapportées en utilisant une concentration de $5,5 \times 10^7$ spores/L de milieu par Perez et Jeffries (1992). Il a été observé aussi que lorsque la concentration de spores est augmentée, le nombre de pelotes est aussi augmenté, mais leur taille est diminuée. Lorsque la taille des pelotes varie entre 1-2 mm de diamètre, une production maximale de ligninases est obtenue. Ce résultat a été rapporté par Leisola et al. (1985) en utilisant un inoculum de 10^6 spores/L de milieu. Donc, on voit une certaine divergence entre les valeurs rapportées de concentrations optimales d'inoculum de spores. Cependant, les résultats obtenus ici montrent clairement que dans notre milieu standard, des concentrations élevées de spores ($4,8 \times 10^8$ spores/L) sont nécessaires pour une production optimale de ligninases.

Des inocula de pelotes mycéliales (Fig. 33), de concentrations de poids sec différentes (1,65% (p/v) (std.) et 2,09% (p/v)), formant 10% (v/v) du milieu furent aussi utilisés dans cette expérience. Des activités LiP plus élevées furent obtenues avec une concentration d'inoculum de 1,65%. Ces résultats ne sont cependant pas en accord avec l'effet établi de la concentration de pelotes sur la production de ligninases. Leisola et al. (1985) ont rapporté que la production de ligninases LiP en cultures agitées était directement proportionnelle à la

Fig. 33 : Effet de la concentration (% p/v poids sec) d'inoculum mycéliel sphérique sur la production de ligninases (milieu standard).



(marge d'erreur= 14,1%)

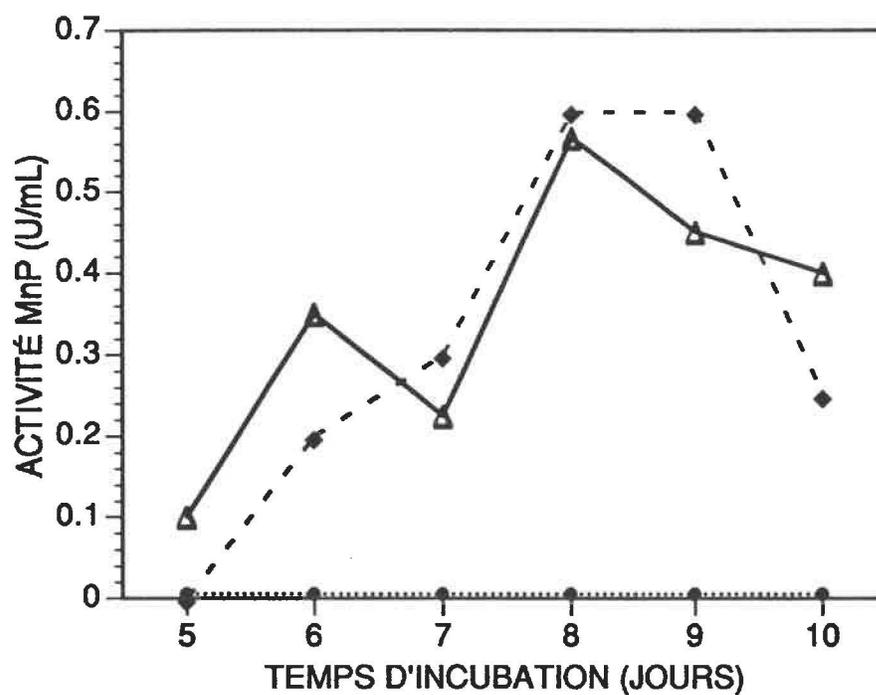
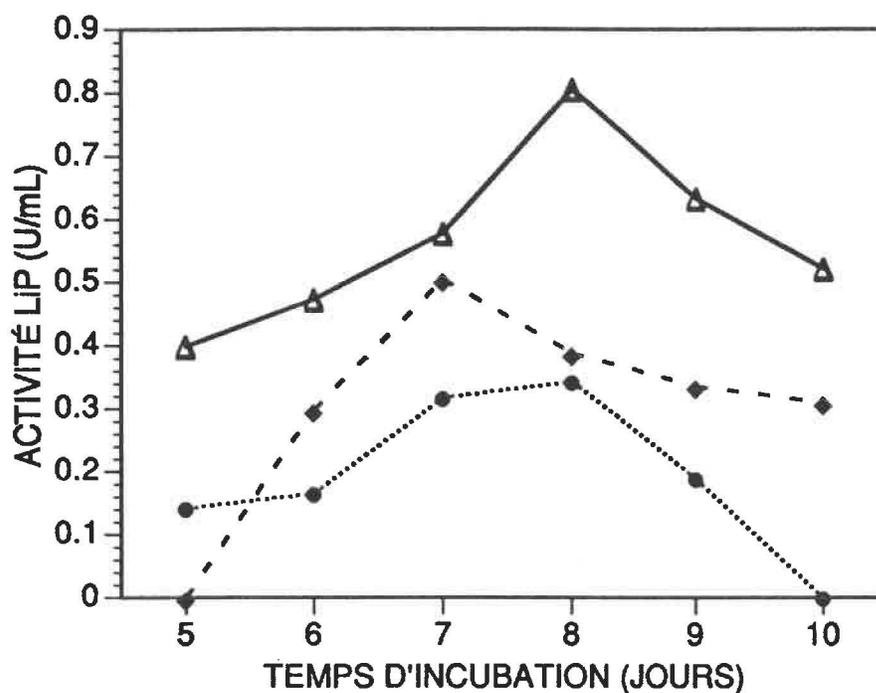
concentration de pelotes mycéliales dans le milieu. L'activité MnP n'a pas été observée dans cette expérience.

Une fois que nous avons établi la concentration optimale de chaque type d'inoculum en milieu standard pour la production de ligninases (Fig. 30-33), nous avons comparé leur meilleur profil respectif de production d'activité ligninases avec le temps d'incubation (Fig. 34). Nous observons à partir de ces résultats que l'inoculum sous forme de broyat mycérial (0,83%) a permis l'obtention d'activités maximales de LiP et MnP, suivi par l'inoculum de spores ($4,8 \times 10^8$ spores/L de milieu), et finalement par l'inoculum de pelotes mycéliales (1,65%), où la production de MnP n'a jamais été observée. Donc, nous pouvons conclure de toutes ces expériences que l'inoculum sous forme de broyat mycérial est la meilleure forme d'inoculum pour une production optimale de ligninases (LiP et MnP).

Observations:

Nous avons observé au cours de ces expériences que l'inoculum mycérial broyé ne forme presque pas de pelotes en milieux contenant des copeaux de bois. La croissance est demeurée sous la forme d'une suspension mycéliale de couleur brunâtre dans le milieu. Durant la phase de croissance, (jour 1 au jour 3 d'incubation) la croissance mycéliale formait un collet mycérial de couleur brunâtre autour de la surface du milieu dans les flacons. Ces collets mycéliaux ont été immergés dans le milieu par une agitation brusque aussitôt qu'ils furent observés. Cependant, dans des expériences où les broyats mycéliaux furent utilisés en absence de copeaux de bois (en milieux

Fig. 34: Effet de divers types d'inoculum (concentrations optimales) sur la production de ligninases (milieu standard).



-●..... Inoculum sphérique (1,65% p/v poids sec)
- ◆- Inoculum de spores (4,8x10 spores/L milieu)
- ▲— Broyat mycéliel (0,83% p/v poids sec)

(marge d'erreur= 12,2%)

synthétiques à base de glucose), ceux-ci se sont développés en morphologie sous forme de flocons mycéliaux ou en agrégats empêchant toute production de ligninases.

Concernant l'inoculum de spores, nous avons observé une suspension trouble semblable à celle observée avec l'inoculum de broyat mycéliel, mais davantage de pelotes furent formées à partir des spores.

Avec l'inoculum de pelotes mycéliales, la taille des pelotes qui, au début de la fermentation était de dimension convenable (1-2 mm de diamètre) a augmenté de volume jusqu'à 3 mm de diamètre durant la fermentation.

Nous pouvons conclure de ces observations et des résultats obtenus que la morphologie obtenue avec l'inoculum de broyat mycéliel en milieu standard à base de copeaux de bois était la plus convenable pour une production optimale de ligninases dû probablement à des meilleurs contacts et échanges possibles de cette morphologie mycéliale avec les nutriments de milieu et l'oxygène dissout, favorisant la production de ligninases. Aussi, un avantage économique de l'utilisation d'inoculum (broyat mycéliel) comparativement à un inoculum de spores est qu'une plus grande période (14 jours) est nécessaire pour produire des spores matures qu'il en faut pour produire un mycélium actif (3 jours) en milieu inoculum, et moins de spores sont nécessaires pour produire un

inoculum de broyat mycéliel que l'utilisation directe des spores pour l'inoculation.

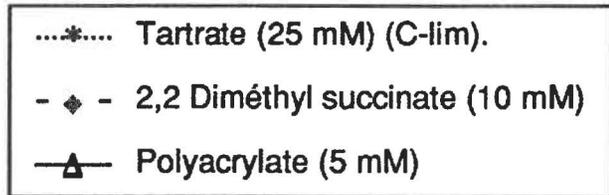
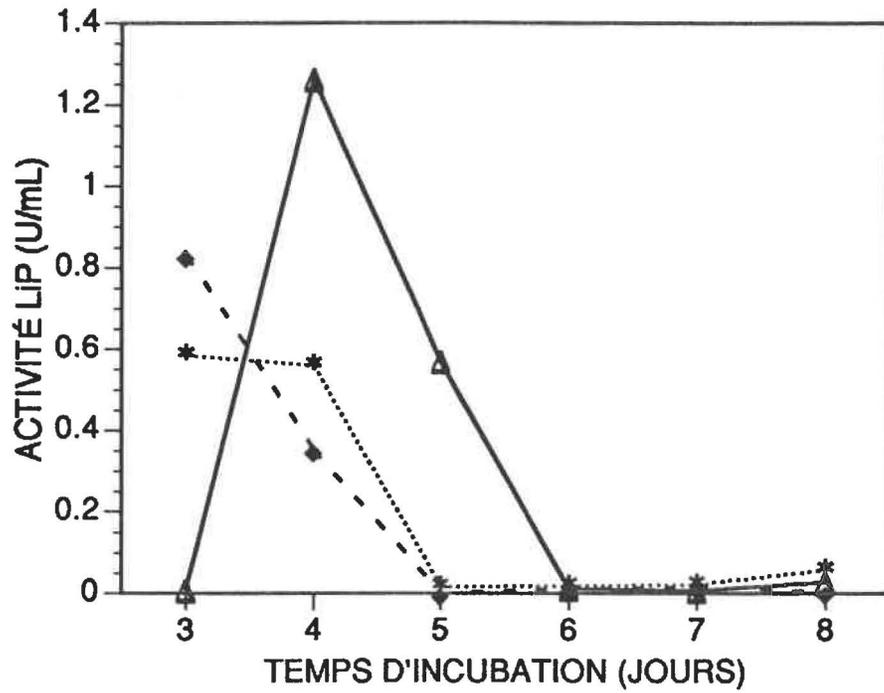
2.19. Effet de l'utilisation de différents tampons avec diverses concentrations de Mn^{2+} sur la production de ligninases (milieu C-limitant):

Des activités ligninases élevées (0,6 U/mL pour LiP et 5,0 U/mL pour MnP) en conditions limitantes en azote furent rapportées par Perez et Jeffries (1992) en utilisant 20 mM d'acide polyacrylique (PAA) pour tamponner le pH à 4,5 et 5,0.

Ici, nous avons comparé l'effet de divers tampons les plus utilisés dans les études antérieures (Perez et Jeffries, 1992; Kirk et al., 1985) pour la production de ligninases: (2,2 diméthyl succinate (10 mM), acide polyacrylique (5 mM), tartrate de sodium (25 mM), à concentration faible (Fig. 35), normale (Fig. 36), et élevée (Fig. 37) de manganèse.

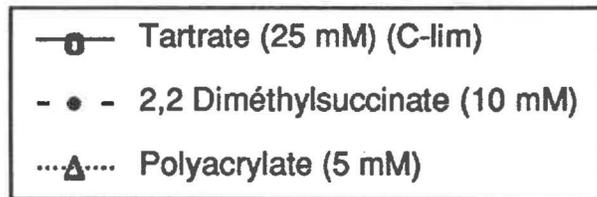
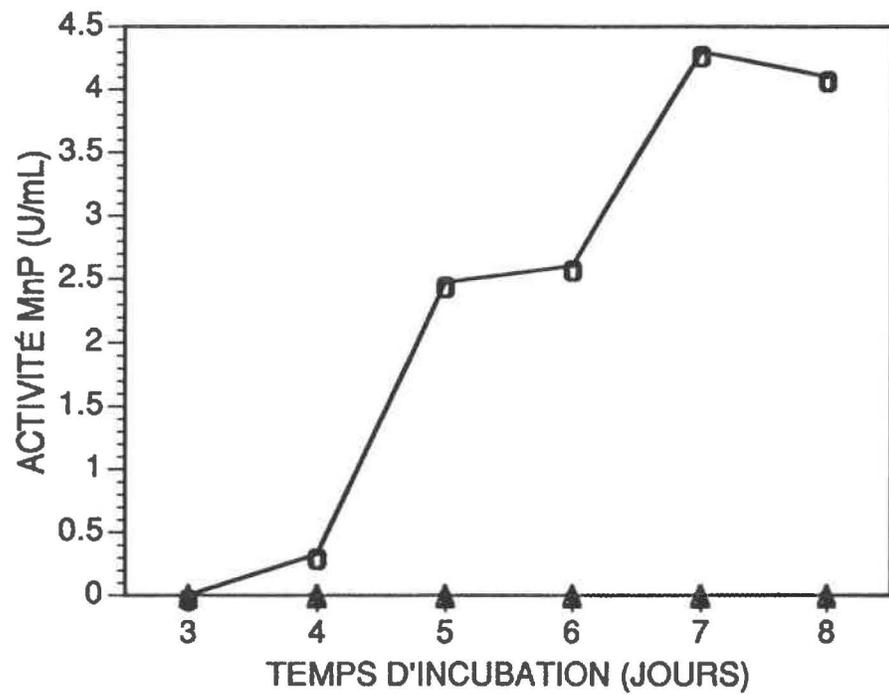
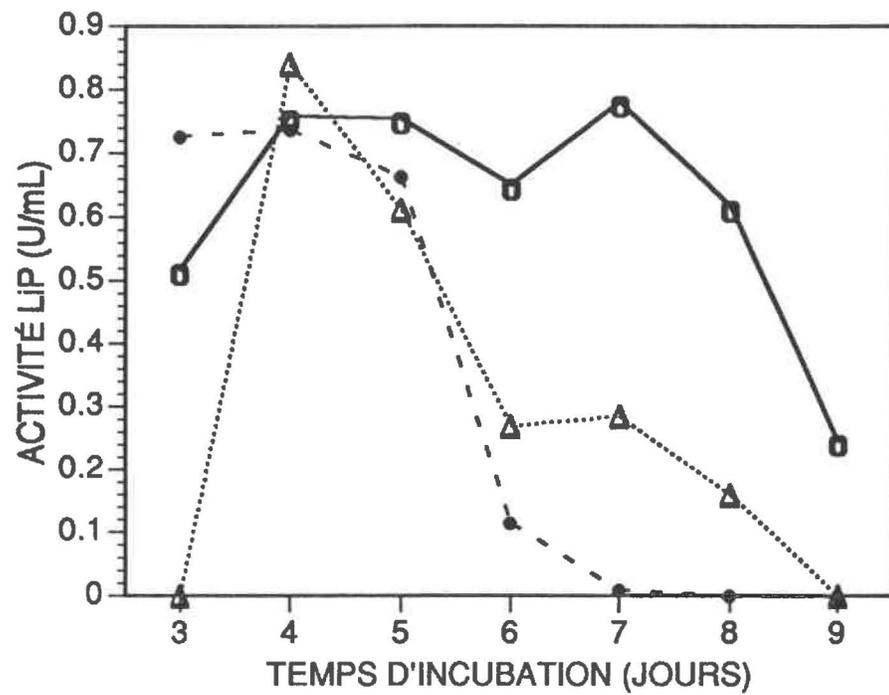
Les résultats présentés en figure 35 montrent qu'à une concentration de 0,3 ppm Mn^{2+} , l'activité MnP fut non détectable, et l'activité maximale de LiP fut obtenue avec le tampon polyacrylate, comparativement aux deux autres tampons utilisés. Cependant, l'activité LiP n'était pas stable, tel qu'observé par un déclin rapide de l'activité après avoir atteint l'activité maximale.

**Fig. 35 : Effet de divers tampons sur la production de ligninases
(milieu C-limitant, [Mn]=0.3 ppm).**



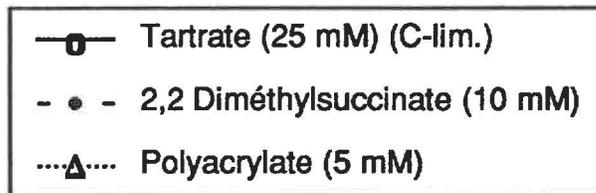
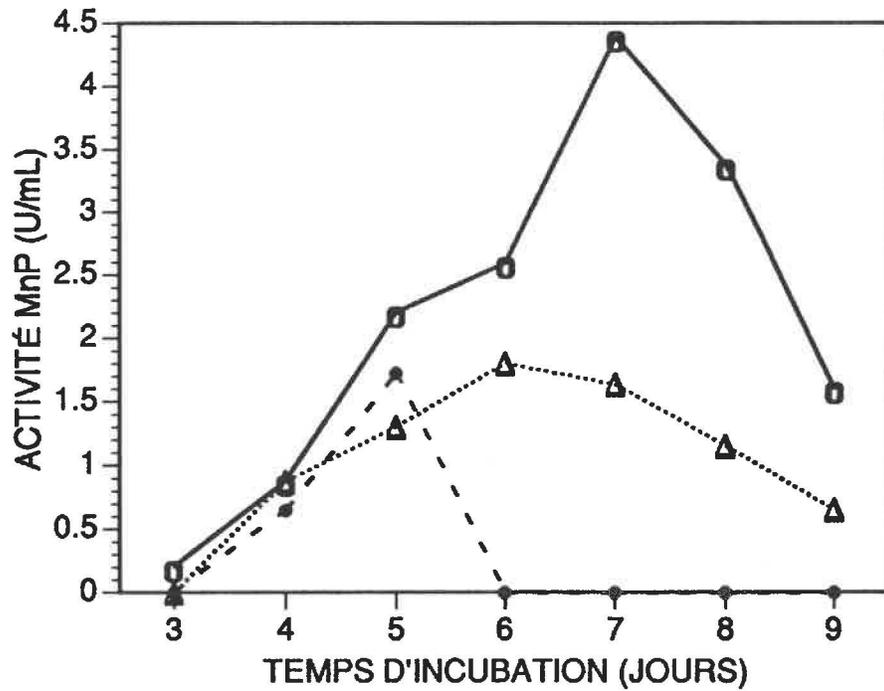
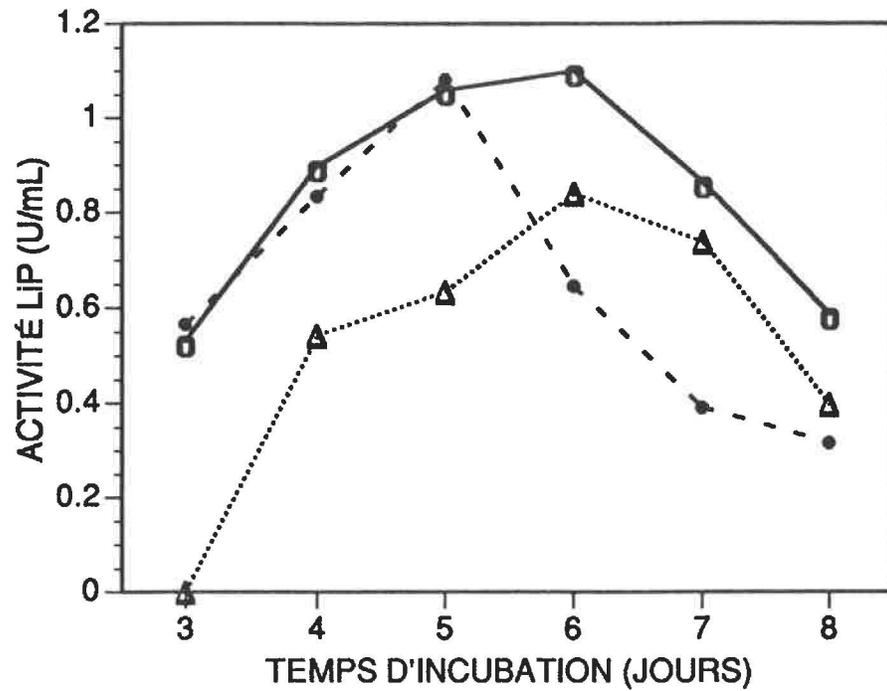
(marge d'erreur= 14,5%)

Fig. 36 : Effet de divers tampons sur la production de ligninases (milieu C-limitant, [Mn]= 11.1 ppm).



(marge d'erreur= 12,9%)

Fig. 37 : Effet de divers tampons sur la production de ligninases (milieu C-limitant, [Mn]= 40 ppm).



(marge d'erreur= 11,0%)

Les résultats présentés en figures 36 et 37 indiquent qu'en général, à des concentrations respectives de 11,1 et 40 ppm de Mn^{2+} avec tampon tartrate, des activités maximales des deux types de ligninases (LiP et MnP) ont été produites, comparativement aux autres tampons utilisés. Les profils d'activités montrent une plus longue période de stabilité (déclin plus lent) de l'activité LiP lorsque tamponné avec tartrate. Les deux autres tampons n'ont pas pu permettre la production de MnP à une concentration de Mn^{2+} de 11,1 ppm. Cependant, avec une augmentation de la concentration de Mn^{2+} à 40 ppm, de bonnes activités MnP furent obtenues avec ces tampons (Fig. 36 et 37).

Ces résultats indiquent que l'utilisation de tampon tartrate avec une concentration élevée de Mn^{2+} (40 ppm) sont des conditions optimales pour la production de ligninases en milieu C-limitant. L'augmentation de l'activité ligninase peut être due au métabolisme du tartrate par le fungus comme source de carbone. Probablement que 25 mM de tartrate est suffisamment limitant comme source de carbone pour éviter tout effet de répression catabolique.

Aussi, à la fin de la fermentation, le pH final indiquait une variation maximale de +/- une unité de pH autour du pH fixé initialement (pH 4,5) avec le tampon tartrate, ce qui est convenable pour la croissance et la production de ligninases. Nous avons aussi observé qu'avec tous les tampons étudiés, il y avait une augmentation de pH plus importante à la fin de la fermentation lorsqu'une

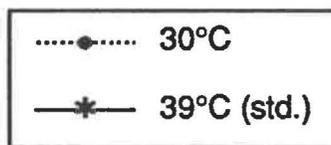
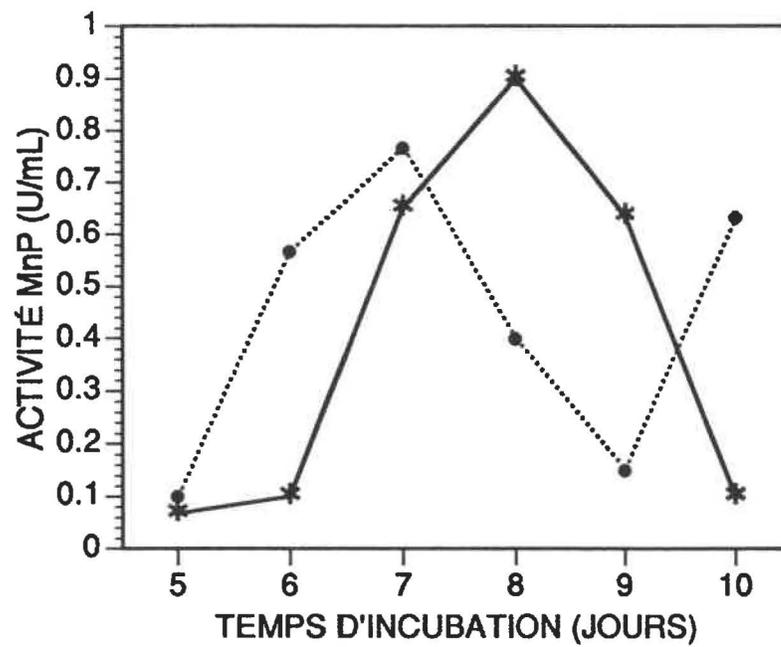
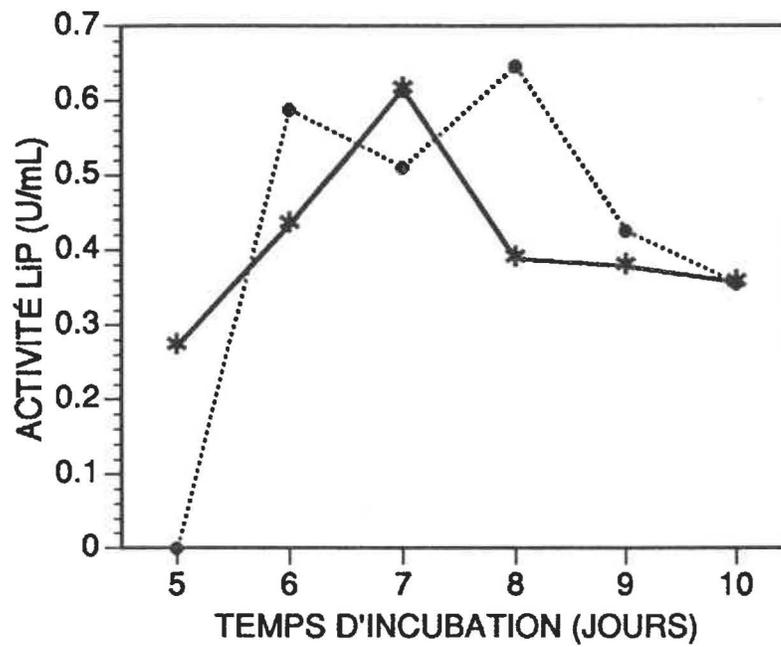
concentration élevée de Mn^{2+} fut utilisée. Cela peut être dû probablement à la formation de MnO_2^- , un produit de l'oxydation de Mn^{2+} , qui aurait augmenté le pH.

2.20. Détermination des conditions optimales (aération, agitation, température) sur la production de ligninases (milieu standard):

Dans la plupart des conditions de culture rapportées pour la production de ligninases en flacons agités, une température de 39°C, une atmosphère de 100% d'oxygène, et une agitation de 50-200 r.p.m. furent utilisées (Janshekar et Fiechter, 1988). Ici, nous avons étudié l'effet d'une température plus basse (30°C) (Fig. 38), l'effet d'une atmosphère d'air (Fig. 39), ainsi que l'effet d'une vitesse plus lente d'agitation (100 r.p.m.) (Fig. 40) sur la production de ligninases, pour comparer avec les conditions rapportées et utilisées dans nos conditions standard.

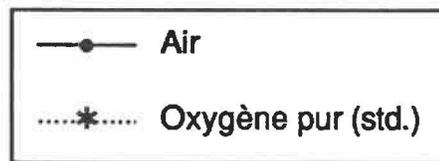
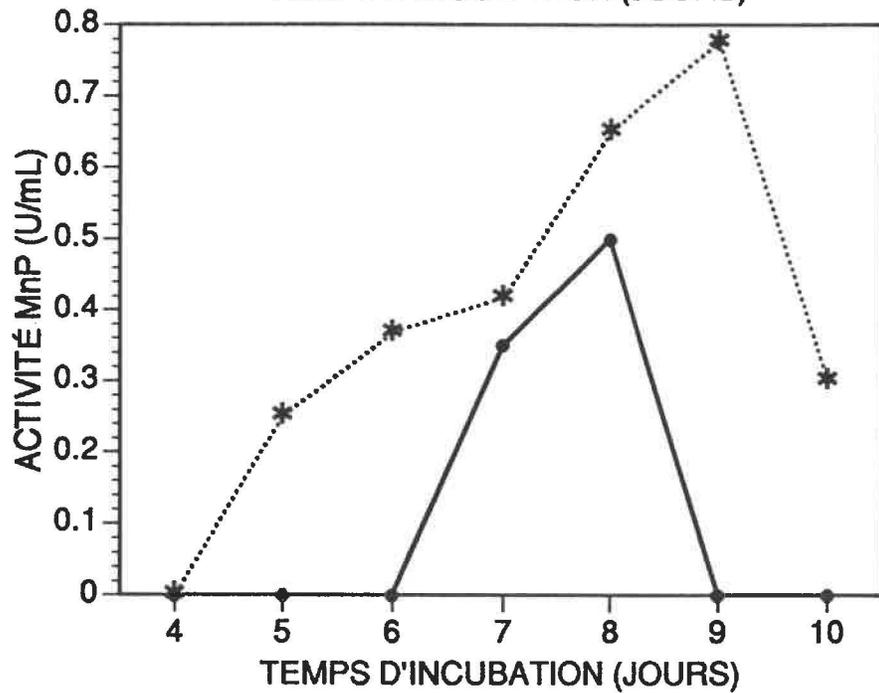
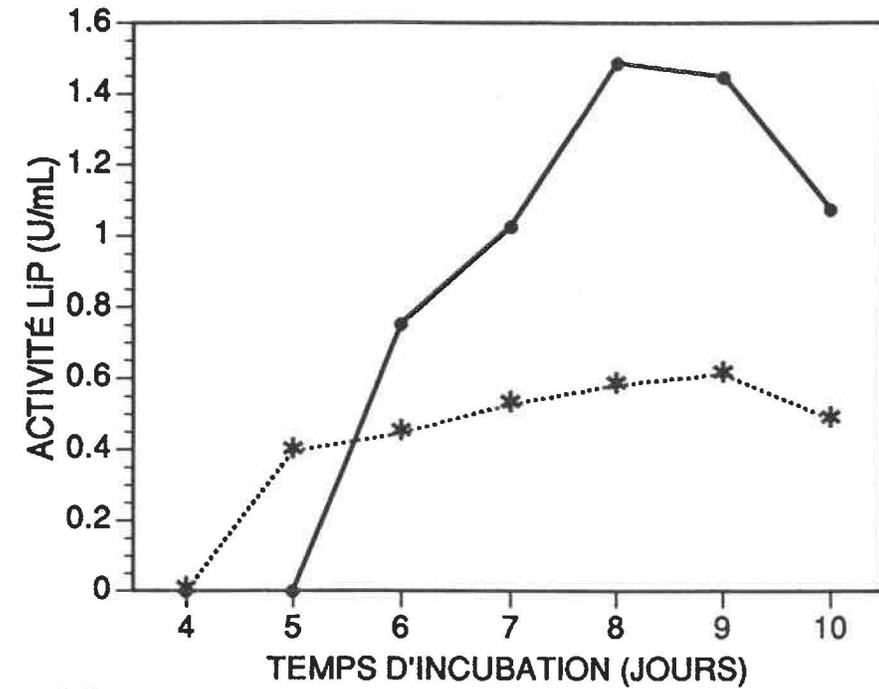
Les résultats indiquent que 30°C est aussi bon que 39°C pour la production des ligninases (Fig. 38), mais les résultats les plus intéressants obtenus dans cette expérience (et probablement dans toute cette étude) furent l'effet de l'atmosphère d'air sur la production de ligninases (Fig. 39). En effet, un maximum d'activité LiP de 1,500 U/mL de milieu fut observé sous un atmosphère d'air. Cela représente plus de 2,5 fois plus de LiP produite que sous une atmosphère

FIG. 38 : Effet de la température sur la production de ligninases (milieu standard).



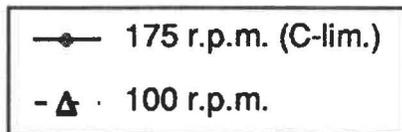
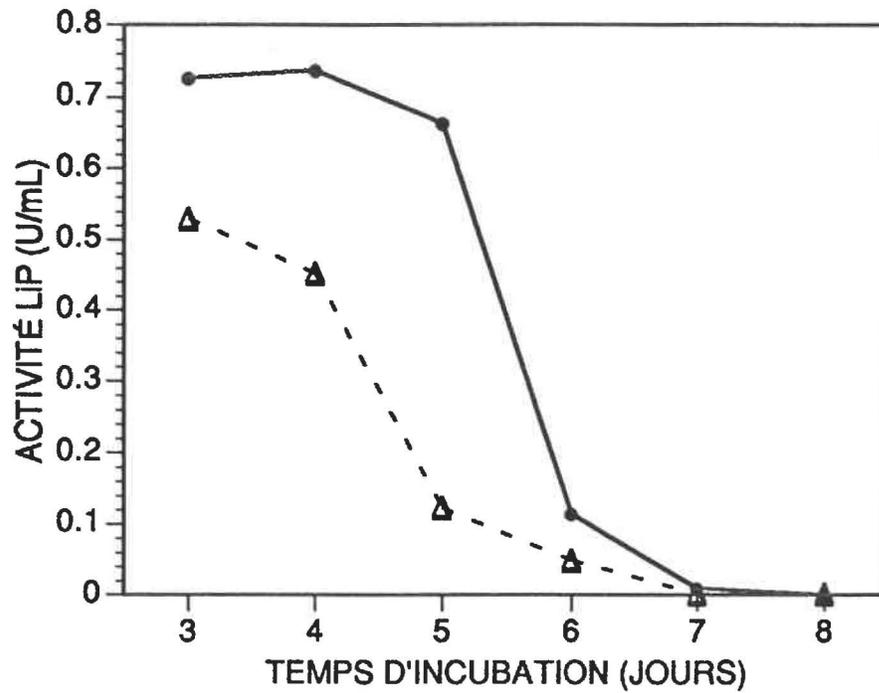
(marge d'erreur= 8,3%)

Fig. 39 : Effet de l'atmosphère sur la production de ligninases (milieu standard).



(marge d'erreur= 13,2%)

**Fig.40 : Effet de la vitesse d'agitation sur la production de ligninases
(milieu C-limitant, tampon 2,2 DMS, [Mn]= 11.1 ppm).**



(marge d'erreur= 15,3%)

saturante en oxygène. Cependant, l'activité MnP fut inférieure dans l'atmosphère d'air que dans celle d'oxygène pur. Donc, comment peut-on expliquer une activité LiP si élevée dans une atmosphère d'air?

Lorsque nous avons utilisé une atmosphère de 100% d'oxygène, nous avons encapsulé les flacons avec des bouchons en caoutchouc. Alors, le système était fermé, et il n'y avait aucune autre supplémentation en oxygène frais pendant les 2 premiers jours d'incubation, et à partir du 2^e jour, une supplémentation était effectuée quotidiennement. Dans les premiers jours de fermentation, il n'était pas rare qu'une pression positive créée dans les flacons, fit sauter les bouchons dans les airs lorsqu'ils n'étaient pas suffisamment serrés, dû à une accumulation de CO₂ produit par oxydation du glucose. Donc, il est possible que dans un tel système fermé, l'atmosphère d'oxygène pur dans les flacons est devenue saturée en déchets métaboliques (CO₂, acides gras volatiles, etc.) produits par le fungus, ce qui aurait eu un effet négatif des conditions atmosphériques pour une production optimale de ligninases. Aussi, même si l'atmosphère d'oxygène pur peut stimuler la production de ligninases, elle peut aussi stimuler la production de H₂O₂ et de radicaux libres de l'oxygène moléculaire (anion superoxyde) pouvant potentiellement inactiver les ligninases produites (Harvey et al., 1987; 1989; Wariishi et Gold, 1989; Cai et Tien, 1989) et peuvent aussi être toxiques pour de fungus.

Cependant, lorsque nous avons utilisé des conditions atmosphériques d'air, nous avons encapsulé les flacons avec des

bouchons en polyuréthane, permettant un flux d'échange constant avec l'atmosphère externe, donc la pression partielle d'oxygène et la condition et composition atmosphérique fut maintenue constante, et les déchets métaboliques ont ainsi pu être éliminés, favorisant le métabolisme fongique et la production de ligninases.

Donc, nous concluons à partir de cette expérience que même en dépit d'une légère diminution d'activité MnP observée, l'utilisation d'une atmosphère d'air dans notre milieu standard à base de copeaux de bois a grandement augmenté la production de ligninase LiP, et offre certains espoirs pour une éventuelle expérience concluante de production de ligninases à plus grande échelle sans besoin d'oxygène pur.

Afin de vérifier si l'agitation à 175 r.p.m. dans nos conditions peut être plus favorable que l'utilisation d'une agitation plus lente (100 r.p.m.) pour la production de ligninases, nous avons comparé les deux vitesses d'agitation (en milieu C-limitant) (Fig. 40). La raison de cette expérience est de vérifier l'observation de Venkatadri et Irvine (1990), selon laquelle une vitesse élevée d'agitation est responsable de l'inactivation mécanique des ligninases.

Les résultats présentés en figure 40 indiquent que des activités LiP plus élevées sont obtenues avec une vitesse d'agitation de 175 r.p.m. comparativement à celle de 100 r.p.m. Deux raisons majeures peuvent expliquer pourquoi 175 r.p.m. fut la condition optimale

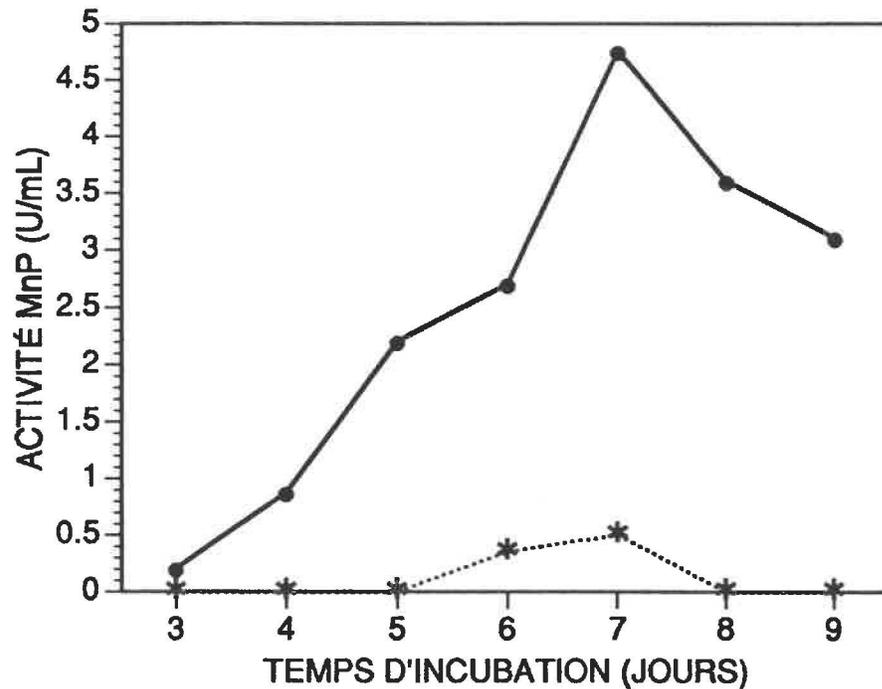
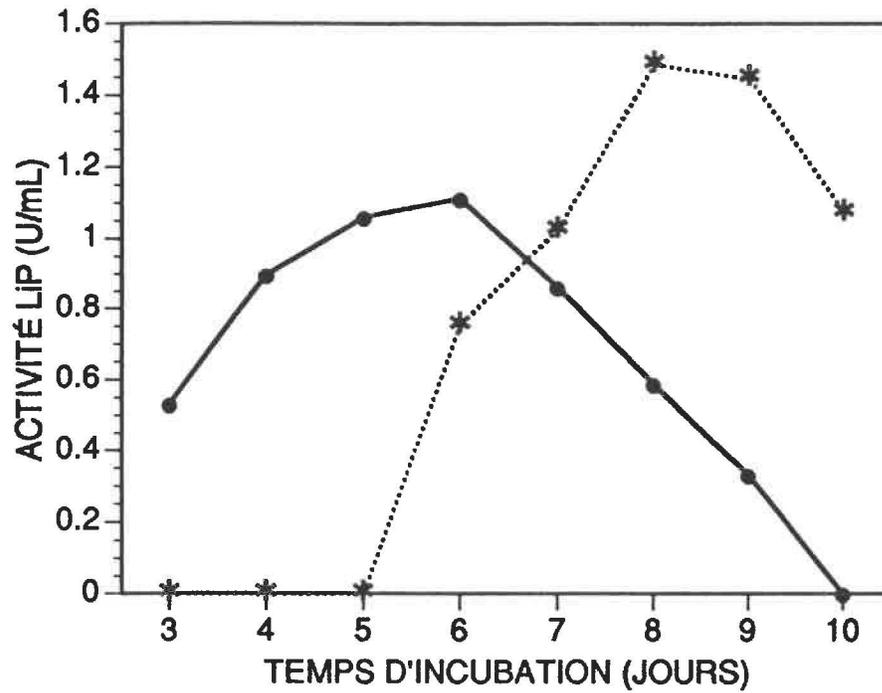
obtenue pour la production de ligninases: premièrement, à une telle vitesse d'agitation, la diffusion d'oxygène dans le milieu liquide est favorisée. Deuxièmement, l'utilisation d'un surfactant comme le PEG 6000 a probablement un effet protecteur sur les ligninases contre l'inactivation mécanique, tel que montré avec les Tweens utilisés par Venkatadri et Irvine (1990).

2.21. Comparaison des meilleurs résultats obtenus à partir des milieux standard et C-limitant optimisés en flacons agités:

Dans cette expérience (Fig. 41), nous avons combiné tous les paramètres optimaux établis avec les milieux standard et C-limitant, afin de déterminer lequel parmi les deux milieux est optimal.

En se basant sur les résultats obtenus dans cette étude, les paramètres optimaux sélectionnés pour le milieu standard sont les suivants (par litre de milieu): 2% copeaux de bois (taille standard); 0,5% glucose; 0,20 g/L diammonium tartrate; 2 g/L extrait de levure (source d'azote organique); 0,25% PEG 6000 (surfactant); 2,5 mM alcool vératrylique (inducteur); 10% d'inoculum (sous forme de broyat mycéliel (0,83% p/v)); 70 mL de solution d'éléments de trace de Kirk (sans manganèse); [Mn]= 11,1 ppm; pH= 4,5; tampon tartrate (25 mM); 30°C; atmosphère d'air; agitation= 175 r.p.m.

Fig. 41 : Comparaison des meilleurs résultats obtenus à partir des milieux standard et C-limitant optimisés pour la production de ligninases, en flacons agités.



.....*..... Milieu standard (Atmosphère d'air, [Mn]=11,1 ppm)
 —●— Milieu C-limitant (Atmosphère d'air, [Mn] = 40 ppm)

(marge d'erreur= 9,1%)

Pour le milieu C-limitant, les paramètres sélectionnés sont les suivants (par litre de milieu): 2% copeaux de bois (taille standard); 0% glucose; 0,66 g/L diammonium tartrate; 0 g/L extrait de levure; 0,25% PEG 6000 (surfactant); 0,35% (v/v) huile de canola (lipide); 2,5 mM alcool vératrylique (inducteur); 10% d'inoculum sous forme de broyat mycéliel (1,65% p/v); 70 mL de solution d'éléments de trace de Kirk (sans manganèse); [Mn]= 40 ppm; pH= 4,5; tampon tartrate (25 mM); 30°C; atmosphère d'air; agitation= 175 r.p.m.

Les résultats (Fig. 41) indiquent qu'avec le milieu standard optimisé, l'activité LiP (1,486 U/mL) est supérieure à celle du milieu C-limitant (1,111 U/mL), mais l'obtention du maximum d'activité LiP est plus rapide en milieu C-limitant optimisé (6 jours) qu'en milieu standard optimisé (8 jours), ce qui donne des productivités identiques en LiP de 0,186 U/mL.Jour, pour les deux milieux.

D'un autre côté, l'activité maximale MnP en milieu standard optimisé est seulement de 0,50 U/mL, comparativement à 4,75 U/mL en milieu C-limitant optimisé, après 7 jours d'incubation pour les deux milieux. Pour le milieu C-limitant optimisé, ceci donne une productivité nettement supérieure en MnP de 0,679 U/mL.jour, comparativement à seulement 0,071 U/mL.Jour pour le milieu standard optimisé.

Aussi, le coût des ingrédients dans la composition du milieu C-limitant optimisé est moins dispendieux que celui du milieu standard optimisé, dû à l'absence d'extrait de levure et de glucose.

Nous concluons, à partir de ces résultats que le milieu C-limitant optimisé est le milieu optimal pour la production des ligninases (LiP et MnP). Donc, c'est selon nous le milieu le plus convenable à utiliser en vue d'une étude de production de ligninases à plus grande échelle.

2.22. Comparaison des meilleures activités ligninases obtenues en laboratoire avec le milieu optimal (C-limitant) et avec les milieux rapportés par Kirk et par Jeffries:

À partir du milieu optimal (milieu C-limitant, [Mn]= 40 ppm) établi dans cette étude, nous avons considéré important de comparer la production de ligninases avec les milieux les plus connus dans la littérature pour la production de ligninases. Ces milieux sont le milieu Kirk limitant en azote (Tien et Kirk, 1988) et le milieu Jeffries (Perez et Jeffries, 1992) (voir compositions des milieux Kirk et Jeffries dans les méthodes). Le milieu de Kirk limitant en azote fut le milieu utilisé au tout début de cette expérience et à partir duquel nous avons effectué des modifications importantes pour la mise au point du milieu standard. Le milieu Jeffries est un milieu modifié de Kirk par Jeffries dont les activités ligninases rapportées dans la littérature sont parmi

les meilleures que nous connaissons (voir tableau 1 pour comparaison des meilleures activités rapportées Kirk et Jeffries avec celles obtenues avec nos conditions établies).

Dans une expérience (Fig. 42), nous avons comparé les productions de ligninases du milieu Kirk (N-limitant) et du milieu modifié de Kirk (2% copeaux de bois) avec le milieu optimal de cette étude ainsi que le milieu standard.

Les résultats ont indiqué clairement que le milieu optimal permet de produire des activités ligninases (LiP et MnP) nettement plus élevées que le milieu Kirk original et modifié que nous avons utilisés au tout début de cette étude. Même les activités obtenues avec le milieu standard sont encore assez faibles comparativement à celles obtenues avec le milieu optimal. Ces résultats résument en eux-mêmes la progression des activités obtenues au cours de cette étude par des modifications successives du milieu Kirk original au milieu Kirk modifié, du milieu Kirk modifié au milieu standard, et du milieu standard au milieu optimal.

Dans une autre expérience (Fig. 43), nous avons comparé la production de ligninases du milieu Jeffries avec tampon polyacrylate (PAA) et tartrate à 0,3 et 40 ppm de Mn^{2+} avec notre milieu optimal (milieu C-limitant avec 40 ppm Mn^{2+}). Dans l'étude rapportée par Jeffries (Perez et Jeffries, 1992), 0,3 ppm de Mn^{2+} a permis de produire des activités élevées en LiP alors que 40 ppm de Mn^{2+} a

Tableau 1

**Comparaison des meilleures activités ligninases rapportées
par d'autres auteurs avec celles obtenues dans nos conditions
(en cultures liquides agitées) avec
P. chrysosporium ATCC-24725.**

Enzyme produite	Valeurs rapportées	valeurs obtenues en laboratoire
LiP (U/mL)	a) 0,143 (6)* c) 0,600 (6) b) 0,670 (2,5) d) 0,600 (10)	f) 1,50 (8) g) 1,111 (6)
MnP (U/mL)	e) 5,00 (8)	h) 1,125 (8) i) 4,75 (7)

Légende:

a) Milieu N-limitant de Kirk (0,1% Tween 80)(Faison et Kirk, 1985)

b) Milieu C-limitant de Kirk (Leisola et al., 1985)

c) Milieu Kirk N-limitant, [Mn]=40 ppm, tampon PAA** (20 mM), pH 5,0
(Perez et Jeffries, 1992)

d) Milieu Kirk N-limitant, [Mn]=0,3 ppm, tampon PAA (20 mM), malate (5 mM), pH 4,5
(Perez et Jeffries, 1992).

e) Milieu Kirk N-limitant, [Mn]= 40 ppm, tampon PAA (20 mM), oxalate (5 mM), pH 4,5
(Perez et Jeffries, 1992).

f) Milieu standard, atmosphère d'air.

g) Milieu C-limitant, atmosphère d'air, [Mn]= 40 ppm.

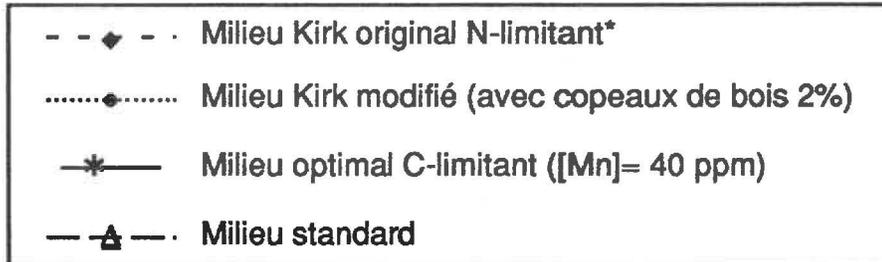
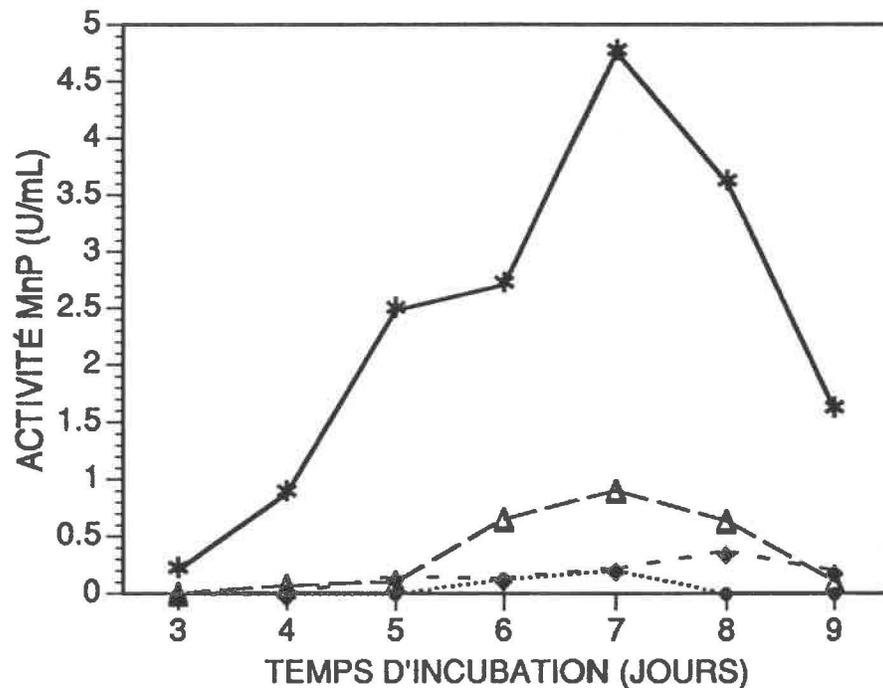
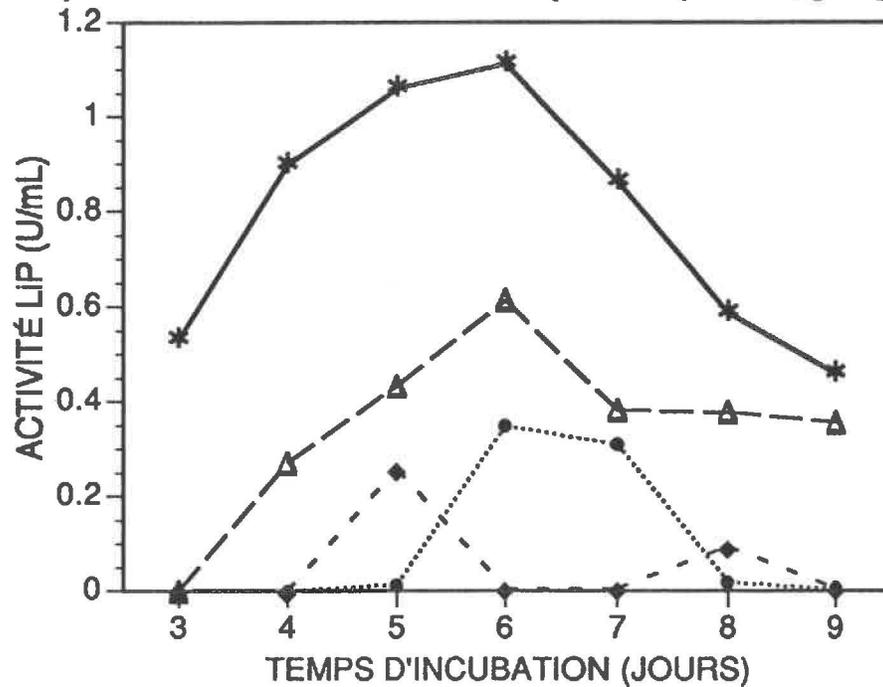
h) Milieu standard, [PEG 6000]= 0,5%

i) Milieu C-limitant, atmosphère d'air, [Mn]= 40 ppm.

* Les nombres entre parenthèses indiquent le nombre de jours d'incubation.

** PAA= Polyacrylate (p.m.: 2000)

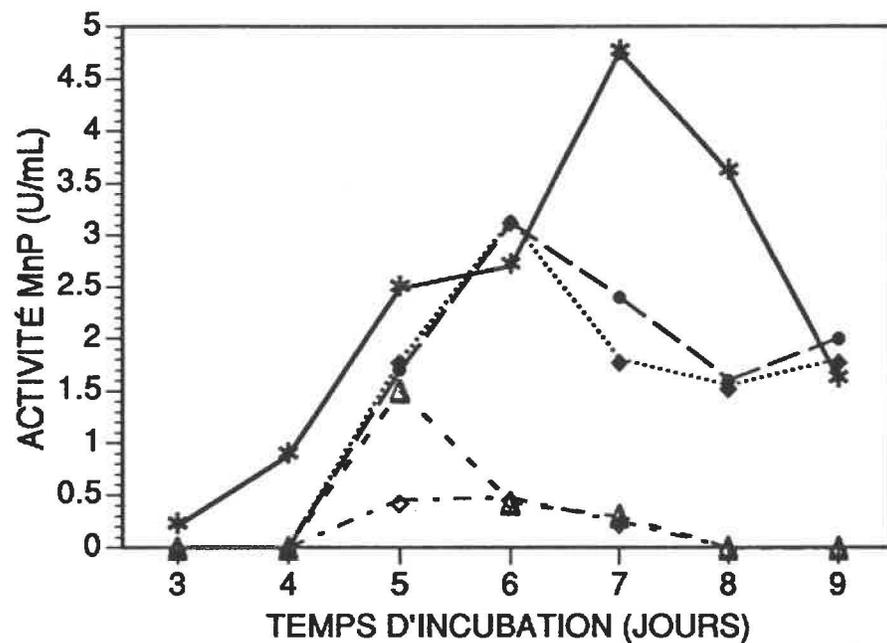
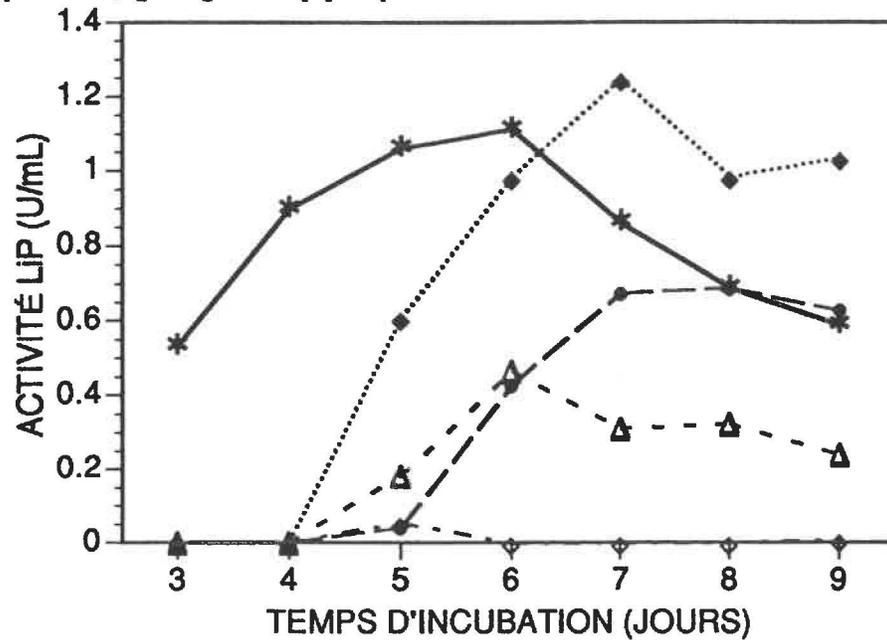
Fig. 42: Comparaison des meilleurs résultats obtenus en laboratoire avec le milieu Kirk N-limitant original* et modifié (2% copeaux de bois) et le milieu std. et milieu optimal (C-lim., [Mn]= 40 ppm)



* (Tien et Kirk, 1988)

(marge d'erreur= 13,6%)

Fig. 43 : Comparaison des meilleurs resultats obtenus en laboratoire avec le milieu Jeffries* et le mileu optimal (C-lim., [Mn]= 40 ppm).



-◆..... Milieu Jeffries* (Tampon PAA (10 mM), [Mn]=0,3 ppm)
- ◆— Milieu Jeffries* (Tampon PAA (10 mM), [Mn]=40 ppm)
- -△ - - Milieu Jeffries* (Tampon tartrate (25 mM), [Mn]= 0,3 ppm)
- -◇ - - Milieu Jeffries* (Tampon tartrate (25 mM), [Mn]= 40 ppm)
- *— Milieu optimal C-limitant ([Mn]= 40 ppm).

*(Perez et Jeffries, 1992)

(marge d'erreur: 16,7%)

permis de produire des activités élevées en MnP. De plus, dans l'étude de Jeffries, l'utilisation de tampon PAA dans le milieu a permis d'obtenir les activités MnP les plus élevées connues à ce jour (5 U/mL), c'est pourquoi nous avons voulu vérifier ces résultats.

Les résultats ont indiqué des activités LiP légèrement supérieures avec le milieu Jeffries tamponné au PAA et 0,3 ppm Mn^{2+} (1,247 U/mL en 7 jours d'incubation) par rapport au milieu optimal (1,111 U/mL en 6 jours d'incubation). Les autres conditions du milieu Jeffries ont permis d'obtenir des activités LiP beaucoup moindres.

Pour l'activité MnP, la production la plus élevée fut obtenue avec le milieu optimal (4,75 U/mL en 7 jours d'incubation) comparativement à 3,15 U/mL en 6 jours avec le milieu Jeffries contenant le PAA et 0,3 ppm de Mn^{2+} .

Si on compare les productivités obtenues en ligninases LiP (0,185 U/mL.Jour) et MnP (0,679 U/mL.Jour) du milieu optimal, avec celles obtenues respectivement (0,178 U/mL.Jour et 0,525 U/mL.Jour), en milieu Jeffries contenant PAA et 0,3 ppm Mn^{2+} , nous constatons que la productivité en ligninases LiP et MnP est plus élevée avec notre milieu optimal.

Nous concluons à partir des résultats obtenus en figures 42 et 43 que notre milieu optimal permet l'obtention d'activités MnP et productivités en ligninases LiP et MnP supérieures à celles que nous

avons obtenues avec des milieux rapportés dans la littérature (voir tableau 2 pour comparaison des activités obtenues en laboratoire avec milieux rapportés et milieu optimal C-limitant). De plus, le milieu optimal, contrairement aux milieux rapportés est le seul qui nous a permis d'obtenir une reproductibilité consistante dans les activités ligninases obtenues. Enfin, notre milieu optimal est plus avantageux économiquement que les milieux rapportés dû à l'utilisation des copeaux de bois comme source de carbone, et l'utilisation d'une atmosphère d'air. Cependant, dans la littérature, des activités LiP encore plus élevées que notre milieu optimal ont été obtenues avec quelques mutants de *P. chrysosporium* hyperproducteurs de ligninases (voir tableau 3).

2.23. Production de ligninases en volume de culture de 3 litres dans un mini-fermenteur artisanal de 4 litres avec le milieu optimal:

Dans cette ultime expérience de production de ligninases, nous avons tenté d'augmenter l'échelle de production de ligninases. Les premières tentatives de production furent effectuées en fermenteur conventionnel à turbines de 10 litres, mais des problèmes d'agitation et d'aération sont survenus dû à la présence des copeaux de bois dans le milieu qui se sont emprisonnés entre les pales à l'intérieur du fermenteur, donc le système était devenu hétérogène, et aucune production de ligninase fut observée.

Tableau 2

Comparaison des meilleures activités ligninases obtenues en laboratoire (FÉL) avec les conditions rapportées et nos conditions optimales (milieu C-limitant optimisé) avec *P. chrysosporium* ATCC-25725.

Valeurs obtenues avec les conditions rapportées		Valeurs obtenues avec nos conditions optimales	
LiP (U/mL)	MnP (U/mL)	LiP (U/mL)	MnP (U/mL)
a) 1,247 (7)*	a) 3,15 (6)	g) 1,111 (6)	g) 4,75 (7)
b) 0,685 (8)	b) 3,13 (6)		
c) 0,465 (6)	c) 1,50 (5)		
d) 0,052 (5)	d) 0,475 (6)		
e) 0,258 (5)	e) 2,20 (8)		
f) 0,349 (6)	f) 0,20 (7)		

Légende:

- a) Milieu Kirk N-limitant, [Mn]= 0,3 ppm, tampon PAA** (10 mM), malate (5 mM), pH 5,0 (Perez et Jeffries, 1992)
- b) Milieu (a), [Mn]= 40 ppm, citrate (5 mM) remplace malate.
- c) Milieu (a), [Mn]= 0,3 ppm, Tampon tartrate (25 mM) remplace PAA.
- d) Milieu (a), [Mn]= 40 ppm, Tampon tartrate (25 mM) remplace PAA.
- e) Milieu Kirk N-limitant, [Mn]= 11,1 ppm, tampon 2,2 DMS** (10 mM), pH 4,5. (Tien et Kirk , 1988)
- f) Milieu modifié de Kirk (Milieu (e) avec 2% copeaux de bois).
- g) Milieu C-limitant, atmosphère d'air, [Mn]= 40 ppm.

* Les nombres entre parenthèses indiquent le nombre de jours d'incubation.

** PAA= Polyacrylate (p.m.: 2000)
2,2 DMS= 2,2 diméthylsuccinate

Tableau 3

**Comparaison des meilleures activités LiP obtenues
et celles rapportées avec divers mutants de
P. chrysosporium ATCC-24725**

Nom de la souche de <i>P. chrysosporium</i>	Valeurs LiP rapportées	Valeurs LiP obtenues
ATCC-24725 (=BKM-F-1767)	a) 0,730 U/mL (5,5 jours)	e) 1,500 U/mL (8 jours)
INA-12	b) 1,800-2,340 U/mL	
CS 26	c) 0,800-1,500 U/mL	
ME 446	d) 0,011 U/mL	

Légende:

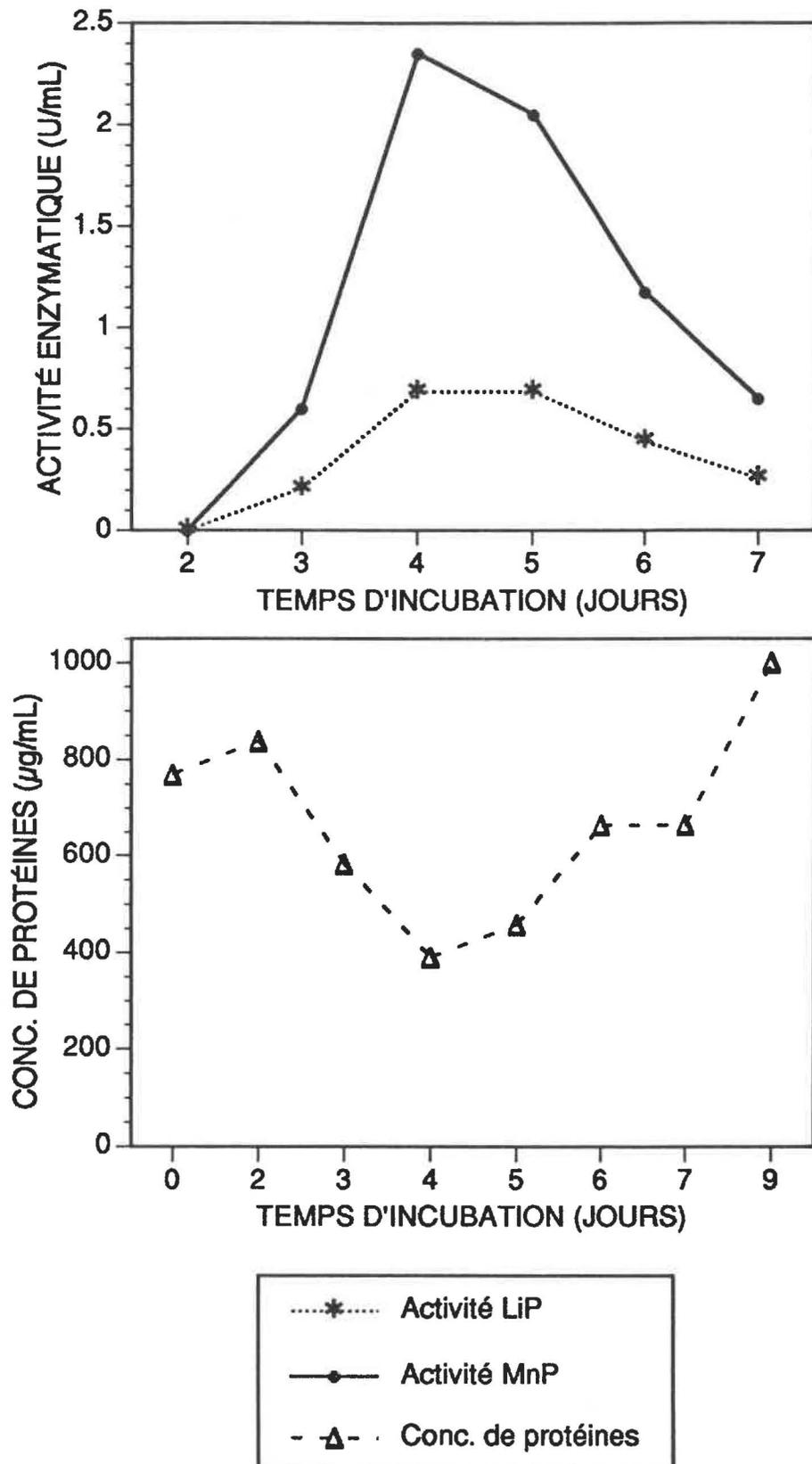
- a) Conditions: En bioréacteur de 10 litres, avec microorganisme immobilisé sur support de nylon. (Linko, 1988 a,b)
- b) Conditions: Cultures en flacons agités, utilisant le glycérol comme source de carbone, et divers triglycérides et phospholipides (Tween 80, acide oléique, huile d'olive, "tall oil", lecithine ou azolectine, autres conditions optimales: 1 g/L d'extrait de levure, 31 °C. (Asther et al., 1987, 1988)
- c) En flacons agités ou en fermenteur à disques rotatifs ("Rotating Biological Contactor") (Kirk et al., 1986 a,b)
- d) En cultures stationnaires.. (Faison et Kirk, 1985)
- e) En flacons agités (milieu standard, atmosphère d'air).

C'est pourquoi nous avons fabriqué un mini-fermenteur artisanal de 4 litres à agitation circulaire et aération avec microdiffuseur à partir d'une cuve en verre. Une évaluation préliminaire du fermenteur nous a indiqué qu'il était tout-à-fait fonctionnel pour le type de milieu et de conditions utilisées.

Donc, nous avons utilisé ce mini-fermenteur d'une capacité de 4 litres pour augmenter notre échelle de production de ligninases. Dans cette expérience, nous avons utilisé 3 litres de milieu optimal C-limitant sans tampon tartrate (le pH était ajusté par un contrôle manuel) (Voir matériels et méthodes pour plus de détails).

Les résultats (Fig. 44) indiquent que les activités maximales de LiP (0,685 U/mL) et de MnP (2,35 U/mL) correspondent respectivement à seulement 62% et 49% de celles obtenues précédemment en flacons agités où le même milieu optimal C-limitant fut utilisé. Cependant, il est intéressant de constater qu'ici le temps d'incubation nécessaire pour l'obtention des activités maximales (4 jours) est presque deux fois plus court que ceux obtenus en flacons agités (7 jours). À partir des activités maximales de LiP et de MnP obtenues lors de la fermentation de 3 litres, nous avons calculé des productivités en ligninase respectivement de 0,171 U/mL.Jour et 0,588 U/mL.Jour, ce qui se compare de très près aux productivités obtenues avec les mêmes conditions en flacons agités (0,186 U/mL.Jour pour LiP et 0,679 U/mL.Jour pour MnP) (voir tableau 4

Fig. 44 : Résultats de la production de ligninases en volume de 3 litres dans un mini-fermenteur artisanal de 4 litres (milieu C-limitant, [Mn]= 40 ppm).



(marge d'erreur= 7,7%)

Tableau 4

Résultats de la production de ligninases en volume de culture de 3 litres en mini-fermenteur artisanal de 4 litres avec *P. chrysosporium* (ATCC-24725):

MILIEU	Activité ligninase (U/mL)	Activité spécifique** (U/mg protéines)	PRODUCTIVITÉ (U/mL. Jour)
Milieu optimal C-limitant ([Mn]=40 ppm)	LiP= 0,685 (4)* MnP= 2,35 (4)	LiP= 1,756 MnP= 6,026	LiP= 0,171 MnP= 0,588

* Les valeurs entre parenthèses indiquent le nombre de jours d'incubation.

** L'activité spécifique est calculée selon la concentration en protéines par mL de milieu au 4e jour de fermentation= 0,390 mg protéines/mL milieu.

pour la compilation des résultats de la production de ligninases en mini-fermenteur artisanal de 4-L).

Afin d'observer ce qui se produit au niveau de la production de protéines (Fig. 44) et pour calculer les activités spécifiques des ligninases (nombre d'unités ligninase/mg de protéine synthétisée), nous avons donc effectué un test protéique de chaque échantillon d'enzyme (surnageant de milieu) analysé.

Les résultats (Fig. 44) ont révélé qu'en début de fermentation, nous avons des concentrations relativement élevées de protéines dans le milieu, qui proviennent probablement de la biomasse mycéliale de l'inoculum (broyat mycéliel). Mais du début de la fermentation au 4^e jour de fermentation, nous avons observé une diminution de la concentration de protéines dans le milieu, suivie par augmentation à des concentrations supérieures à celles observées au début de la fermentation. Ces résultats suggèrent que dans nos conditions optimales C-limitantes, la biomasse mycéliale aurait métabolisé (par autocatabolisme) ses propres protéines solubles disponibles dans le milieu (libérées par broyage de l'inoculum mycéliel), résultant en une diminution du contenu protéique dans le milieu. Mais, après le 4^e jour, une augmentation constante de protéines dans le milieu fut observée. Cette augmentation de protéines doit être due à la présence de nouvelles protéines synthétisées par le fungus. En comparant les profils d'activités ligninases et de concentration de protéines, on remarque qu'au 4^e jour de fermentation, il y a une concentration

minimale de protéines mais des niveaux maximaux de ligninases dans le milieu. Lorsque nous avons calculé les activités spécifiques de chaque type de ligninase (i.e. U/mg protéine) pour chaque jour d'incubation, les résultats ont indiqué que l'activité spécifique maximale de chaque type de ligninase fut obtenue le même jour (4e jour) i.e. 1,756 U LiP/mg protéines, 6,026 U MnP/mg protéines (Fig. 45).

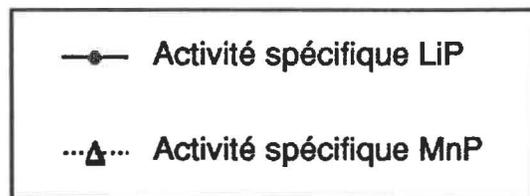
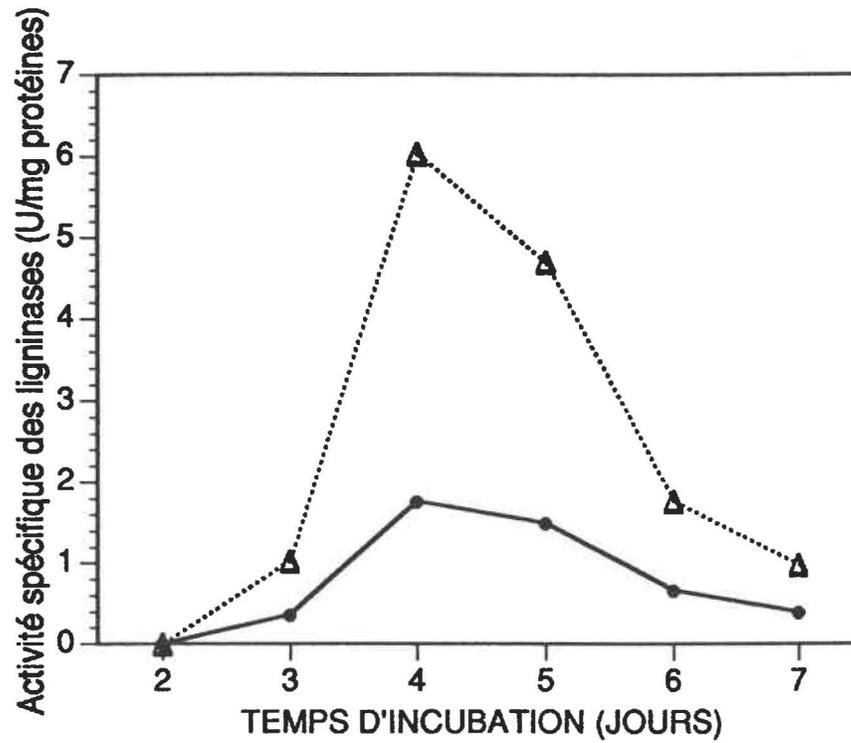
Nous pouvons conclure de cette expérience que l'augmentation de la production de ligninases avec notre milieu optimal en volume de culture de 3 litres fut réussie avec succès, puisque même si les activités LiP et MnP obtenues étaient inférieures à celles obtenues en flacons agités, les productivités respectives sont demeurées comparables.

3. RÉSULTATS DE LA FERMENTATION À L'ÉTAT SOLIDE (FÉS):

3.1. INTRODUCTION

L'un des objectifs de cette étude était de valoriser l'utilisation d'une matière lignocellulosique, le bois, comme substrat carboné pour la production de ligninases. C'est pourquoi nous avons étudié les différentes possibilités d'application avec ce substrat pour la production de ligninases.

Fig. 45 : Activités spécifiques des ligninases produites durant la fermentation en mini-fermenteur artisanal de 4 litres.



(marge d'erreur= 12,4%)

Donc, en plus de la fermentation à l'état liquide (FÉL), la fermentation à l'état solide (FÉS) fut aussi utilisée dans cette étude afin de comparer l'effet de certains paramètres sur la production de ligninases.

Dans la fermentation à l'état solide, nous avons récolté les enzymes par pressage du milieu de fermentation dans un coton-fromage afin d'obtenir un extrait liquide contenant les enzymes. Avec une composition de 90 mL de milieu/20 g copeaux de bois, nous avons récolté environ 25 mL de volume total d'extrait d'enzymes, et environ 15 mL avec une composition de 60 mL de milieu liquide/20 g copeaux de bois. Avec une composition de milieu 90 mL milieu liquide/20 g bois moulu de 20 mesh, nous avons récolté environ 65 mL de volume total d'extrait d'enzymes, et environ 40 mL avec une composition de 60 mL de milieu liquide/20 g bois moulu.

3.2. Effet des nutriments et de divers tampons sur la production de ligninases en fermentation à l'état solide (milieu standard):

Dans cette première expérience de fermentation à l'état solide (FÉS) pour la production de ligninases (Tableau 5), nous avons étudié l'effet de la présence ou de l'absence des ingrédients dans le milieu standard (22,5 mL/5 g copeaux de bois) en flacons: En absence d'ingrédients (i.e. seulement avec l'eau distillée), aucune production de ligninases ne fut observée. Après 42 jours d'incubation, nous avons

Tableau 5: Effet des nutriments et de divers tampons sur la production de ligninases.

COMPOSITION DU MILIEU:	Croissance (Jours)	LiP (U/mL)	MnP (U/mL)	Laccase (U/mL)
Seulement avec eau (en flacons)	35	0	0	0.03
	42	0	0	0.0315
Seulement glucose 3% (en flacons)	35	0	0	0.033
	42	0	0	0.050
AVEC NUTRIMENTS (Milieu std.)				
Tampon acétate Avec Tween 80 (0.05%)	35	0.067	0.133	0.045
	35	0.064	0.267	0.040
Tampon acétate avec PEG 6000 (0.25%)	14	0.116	0.297	0.048
	21	0.164	0.364	0.048
	28	0.112	0.067	0.043
Tampon tartrate avec Tween 80 (0.05%)	14	0.118	0.267	0.045
	21	0.115	0.200	0.055
	28	0.096	0.067	0.055

(marge d'erreur= 16,6%)

observé que la croissance fut aussi très lente et très faible. En supplémentant l'eau distillée avec 3% de glucose, la croissance mycéliale fut améliorée, mais là encore, aucune activité ligninase fut obtenue. Cependant, de très faibles activités laccase furent observées dans les deux cas.

Ces résultats indiquent que dans les conditions naturelles (i.e. sans aucun autre ingrédient que l'eau distillée dans les copeaux de bois), seulement l'activité laccase fut observée. Aucune amélioration de l'activité laccase ou des ligninases (LiP et MnP) ne fut observée lorsque une source additionnelle de carbone comme le glucose fut ajoutée dans le milieu. Il faut cependant tenir-compte que cette expérience fut effectuée en flacons et non pas à l'intérieur de boîtes en acier inoxydable, comme dans les expériences suivantes.

Les premiers résultats nous ont suggéré d'utiliser les ingrédients du milieu standard afin de supporter au maximum la croissance et la production de ligninases. Donc, dans une deuxième expérience, nous avons étudié l'effet de la présence de tous les ingrédients de milieu standard (90 mL milieu std. liquide/20 g copeaux de bois) avec divers tampons et surfactants sur la production de ligninases.

Par l'addition de ces ingrédients, toutes les ligninases (LiP et MnP) furent produites. Les meilleures activités ligninases furent obtenues en utilisant le tampon tartrate et le Tween 80 (0,05%) comme surfactant, après 21 jours d'incubation (Tableau 5). Cependant,

avec le PEG 6000, les activités maximales de ligninases furent observées après seulement 14 jours, et leurs niveaux étaient presque équivalents à ceux obtenues avec le Tween 80, alors qu'en cultures submergées, nous avons observé que le PEG 6000 fut un meilleur surfactant que le Tween 80.

3.3. Effet du malonate et de l'ion manganèse sur la production de ligninases (milieu standard avec 0,05% de Tween 80):

Dans cette expérience (Tableau 6), nous avons comparé l'effet de niveaux normaux (11,1 ppm) ou élevés (40 ppm) de Mn^{2+} en milieu standard, en présence ou absence de 5 mM malonate, reconnu comme étant un agent chélateur efficace de l'ion Mn^{2+} , et permettant de stabiliser la forme réduite (2+) de Mn^{2+} , impliquée dans l'induction de l'activité MnP (Perez et Jeffries, 1992). Rappelons qu'une concentration élevée de Mn^{2+} stimule la production de MnP, mais réprime aussi celle de LiP jusqu'à ce que le Mn^{2+} soit oxydé sous forme de MnO_2^- (Perez et Jeffries, 1992). De plus, la MnP est surtout responsable de la dépolymérisation oxydative de la lignine et du bioblanchiment de la pâte de papier (Archibald, 1992). Dans cette expérience, les concentrations utilisées de Mn^{2+} furent étudiées en milieu standard (90 mL/20 g copeaux de bois) avec 0,05% Tween 80 comme surfactant.

En FÉS, il semble ne pas y avoir d'effet significatif de la concentration de manganèse en absence ou présence de malonate sur

Tableau 6: Effet du malonate et de l'ion manganèse sur la production de ligninases (milieu standard).

COMPOSITION:	Croiss. (Jours)	LiP (U/mL)	MnP (U/mL)	Laccase (U/mL)
Tampon tartrate Avec Tween 80 (0.05%)				
Sans malonate conc. Mn = 11.1 ppm.	28	n.d.	n.d.	n.d.
	35	0.199	1.20	0.05
Avec malonate conc. Mn = 11.1 ppm.	28	0.092	0.167	0.060
	35	0.112	0.667	0.038
Sans malonate conc. Mn = 40 ppm.	28	0.176	0.97	0.049
	35	n.d.	n.d.	n.d.
Avec malonate conc. Mn = 40 ppm.	28	0.197	1.267	0.045
	35	0.178	1.167	0.020

(marge d'erreur= 14,8%)

la production de ligninases, d'après les résultats obtenus. Des niveaux maximaux d'activité LiP et MnP furent obtenus avec 40 ppm de Mn^{2+} (avec le malonate), et avec 11,1 ppm Mn^{2+} sans malonate. Avec 11,1 ppm Mn^{2+} (avec malonate), et 40 ppm Mn^{2+} (sans malonate), une diminution de l'activité des deux ligninases fut observée, ne démontrant donc pas d'effet de l'ion manganèse sur la production de LiP et MnP, tel qu'observé en milieux liquides avec le milieu standard avec les mêmes concentrations de Mn^{2+} , et différemment des résultats rapportés en milieux synthétiques avec glucose comme source de carbone (Bonnarne et Jeffries, 1990). Comme nous en avons discuté en milieu liquide, c'est probablement dû à la nature très différente des conditions utilisées ici que les résultats ne sont pas compatibles avec ceux rapportés.

3.4. Effet de la concentration des ingrédients du milieu sur la production de ligninases (milieu standard, conc. de Mn^{2+} = 40 ppm):

Les résultats de l'expérience précédente (Tableau 6) ont clairement indiqué que les activités ligninases et laccase sont supérieures lorsque la concentration utilisée d'ingrédients du milieu est de 1x la concentration standard, comparativement à des concentrations plus élevées d'ingrédients. Donc, dans cette expérience (Tableau 7), 1x la concentration standard d'ingrédients est la concentration optimale pour la production de ligninases. De plus, nous avons observé que des concentrations élevées d'ingrédients diminuent

Tableau 7: Effet de la concentration du milieu sur la production de ligninases (milieu standard, [Mn]= 40 ppm).

COMPOSITION:	Croissance (Jours)	LiP (U/mL)	MnP (U/mL)	Laccase (U/mL)	Croissance observée
Tampon Tartrate avec PEG 6000 (0.25%)					
Concentration du milieu:					
11 X	14	0	0.00	0.125	non
	21	0	0.00	0	non
5.5 X	14	0.013	0.00	0.140	non
	21	0	0.00	0	non
2.2 X	14	0.011	0.200	0.090	oui
	21	0.018	0.300	0.071	oui
1.0 X	14	0.118	0.633	0.123	oui
	21	0.257	1.900	0.028	oui

(marge d'erreur= 15,1%)

ou empêchent la croissance, ce qui est attribuable à un effet délétère d'une trop grande concentration d'ingrédients sur les cellules fongiques. Cependant, des activités laccase comparables furent obtenues à toutes les concentrations de milieu, probablement dû à une interférence de certaines substances du milieu dans l'essai enzymatique.

3.5. Effet de la dilution de la quantité des ingrédients dans le milieu standard et comparaison de l'effet des copeaux de bois et du bois moulu (20 mesh) sur la production de ligninases:

Dans cette expérience (Tableau 8), nous avons comparé l'effet de diverses dilutions de la concentration des ingrédients du milieu afin de déterminer la quantité optimale d'ingrédients pour la production de ligninases. Nous avons utilisé moins de liquide dans le milieu que dans les expériences précédentes, parce que nous nous sommes rendus-compte durant les expériences précédentes qu'une certaine quantité de liquide s'égoutait hors du milieu de bois, dû à une condensation dans le milieu pendant la fermentation, mais la quantité d'ingrédients dans le milieu est demeurée la même que précédemment. (Tous les ingrédients contenus dans 90 mL de milieu std. requis pour 20 g de bois furent dissouts dans 60 mL pour réduire la quantité de liquide).

Les activités maximales de LiP et de laccase furent obtenues avec 1x la quantité habituelle (standard) des ingrédients dans le milieu, tel

Tableau 8: Effet de la quantité de nutriments du milieu et comparaison de l'effet des copeaux de bois (~30 mm³) et du bois moulu (20 mesh) sur la production de ligninases (milieu standard, [Mn]= 40 ppm).

COMPOSITION:	Croissance (Jours)	LiP (U/mL)	MnP (U/mL)	Laccase (U/mL)	Croissance observée	
Copeaux de bois (60 mL milieu (1,5x conc.)/ 20 g copeaux de bois) Quantité d'ingrédients: 1 x std. 1/2 x std. 1/4 x std. 1/8 x std.	21	0.414	1.60	0.075	oui	
	28	0.22	0.85	0.027	oui	
	21	0.197	1.65	0.03	oui	
	28	0.138	0.80	0.035	oui	
	21	0.178	1.60	0.039	oui	
	28	0.128	0.75	0.014	oui	
	21	0.018	0.15	0.035	oui	
	28	0.007	0.20	0	oui	
	Bois moulu (20 mesh) (60 mL milieu (1,5x conc.)/ 20 g bois moulu (20 mesh)) 1 x std. 1/2 x std. 1/4 x std.	21	0.109	0.50	0.039	oui
		28	0.089	0.60	0.007	oui
		21	0.115	0.70	0.026	oui
		28	0.095	0.60	0.043	oui
21		0.095	0.30	0.036	oui	

(marge d'erreur= 15,3%)

qu'observé dans l'expérience précédente (Tableau 7). La dilution des ingrédients a résulté en une diminution de la production de LiP. Cependant, les activités MnP n'ont pas été affectées par les dilutions de la quantité des ingrédients. Ces résultats indiquent qu'en FÉS, une concentration moins élevée des ingrédients du milieu standard peut être requise plutôt qu'en FÉL pour la production optimale de MnP, mais nous concluons à partir de cette expérience que la quantité optimale des ingrédients est de 1x la quantité standard parce qu'elle permet d'obtenir l'activité totale de ligninases la plus élevée.

Avec le bois moulu (20 mesh), des activités maximales de LiP et MnP et laccase furent obtenues à 1x et 1/2x la quantité standard des ingrédients. Ici, nous voyons donc plus clairement qu'une concentration moindre d'ingrédients du milieu standard (1/2x) est requise en FÉS pour produire des ligninases que dans les expériences de la FÉL (1x).

Si nous comparons l'effet des copeaux de bois et du bois moulu, des activités nettement plus élevées en ligninases (LiP et MnP) et laccase sont obtenues avec les copeaux de bois.

3.6. Effet de diverses sources d'azote organique sur la production de ligninases:

(Tous les ingrédients provenant de 90 mL de milieu/20 g bois furent dissouts dans 60 mL).

Dans cette expérience, nous avons comparé certaines des sources d'azote organique utilisées en FÉL, pour la production de ligninases en FÉS (Tableau 9).

Lorsque nous avons comparé les activités LiP et MnP obtenues avec les diverses sources d'azote organique, nous avons obtenu l'ordre décroissant suivant à partir de la source permettant l'obtention d'activité LiP maximale:

Extrait de levure > caséine > farine de soya > peptone > casamino acids (hydrolysate acide de caséine) > soytone (hydrolysate de protéine de soya).

Et les activités MnP furent obtenues dans l'ordre décroissant suivant:

Caséine = peptone > farine de soya > extrait de levure > soytone > casamino acids.

Cependant, l'activité laccase fut comparable avec toutes les sources d'azote. Ces résultats sont intéressants puisque la caséine, dont le coût est moins élevé que l'extrait de levure, a permis de produire les activités maximales de MnP, après seulement 21 jours d'incubation. L'extrait de levure et la peptone sont les sources d'azote les meilleures après la caséine, mais leur coût est plus dispendieux. Cependant, parmi tous ces ingrédients, nous observons que l'extrait de levure permet de produire des activités LiP plus élevées que toute autre source d'azote organique.

Tableau 9: Effet de diverses sources d'azote organique sur la production de ligninases (milieu standard, [Mn]= 40 ppm).

COMPOSITION:	Croissance (Jours)	LiP (U/mL)	MnP (U/mL)	Laccase (U/mL)	Croissance observée
Copeaux de bois (60 mL milieu (1,5x conc.)/ 20 g copeaux de bois)					
Extrait de levure (3 g/L)	21	0.217	1.30	0.1	oui
	28	0.48	1.15	0.078	oui
Farine de soya (3 g/L)	21	0.171	1.70	0.075	oui
	28	0.138	1.05	0.065	oui
Soytone (3 g/L)	21	0.125	1.10	0.075	oui
	28	0.148	0.80	0.06	oui
Caséine (3 g/L)	21	0.184	2.30	0.073	oui
	28	0.138	0.85	0.068	oui
Casamino acids (3 g/L)	21	0.128	0.60	0.07	oui
	28	0.168	0.55	0.08	oui
Peptone (3 g/L)	21	0.174	2.30	0.08	oui
	28	0.118	0.95	0.07	oui

(marge d'erreur= 13,5%)

Il est possible que la caséine soit une source d'azote plus lentement assimilable que les autres comparées ici, qui sont principalement des extraits, digestats et hydrolysats. Cette lente assimilation de la caséine pourrait favoriser le maintien des conditions limitantes en azote dans le milieu, mais aussi pourrait favoriser le maintien de la viabilité du fungus pour une plus longue période de temps. Dans de telles conditions, la production de ligninases serait favorisée, comme les résultats l'indiquent.

3.7. Effet de diverses concentrations d'huile d'olive sur la production de ligninases:

(Tous les ingrédients contenus dans 90 mL requis pour 20 g de bois ont été dissouts dans 60 mL).

Dans cette expérience (Tableau 10), nous avons comparé l'effet de diverses concentrations d'huile d'olive sur la production de ligninases. Il n'y avait pas de glucose utilisé dans cette expérience, et la quantité de milieu contenant le bois moulu fut doublée par rapport à celle utilisée avec les copeaux de bois. Les résultats indiquent clairement un effet positif de l'huile d'olive sur la production de LiP, MnP et laccase avec les copeaux de bois aussi bien qu'avec le bois moulu. Cependant, avec le milieu de bois moulu, les activités ligninases sont légèrement plus basses que celles obtenues avec les copeaux de bois.

Tableau 10: Effet de diverses concentrations d'huile d'olive sur la production de ligninases (milieu standard, 0% glucose, [Mn]= 40 ppm).

COMPOSITION:	Croissance (Jours)	LiP (U/mL)	MnP (U/mL)	Laccase (U/mL)	Croissance observée	
(60 mL milieu (1,5x conc.)/ 20 g copeaux de bois)	0% d'huile	21	0.132	1.45	0.075	oui
		28	0.155	1.00	0.063	oui
	0,15% d'huile	21	0.237	1.90	0.098	oui
		28	0.164	1.00	0.08	oui
	0,375% d'huile	21	0.28	2.50	0.075	oui
		28	0.178	0.80	0.063	oui
(120 mL milieu (1,5x conc.)/ 40 g bois moulu (20 mesh))	0% d'huile	21	0.128	1.10	0.083	oui
		28	0.079	1.50	0.065	oui
	0,15% d'huile	21	0.211	1.50	0.088	oui
		28	0.082	1.35	0.073	oui
	0,375% d'huile	21	0.252	1.50	0.08	oui
		28	0.033	1.40	0.073	oui

(marge d'erreur= 12,4%)

Il a déjà été rapporté avec *Pleurotus ostreatus floridae* (Schiesser et al., 1989) que l'utilisation d'huile de tournesol en milieu submergé inhibe l'action des cellulases, et de ce fait, favorise la production de laccase et la biodégradation de la lignine.

Dans cette expérience de FÉS, dû à la présence d'huile, nous pouvons assumer que l'action des cellulases fut inhibée, favorisant une limitation en carbone équivalente à celle retrouvée dans les copeaux de bois, ce qui a stimulé la production de ligninases et la ligninolyse, jusqu'à épuisement de l'huile comme source de carbone.

4. Comparaison des meilleurs résultats obtenus en FÉS et FÉL:

En FÉL, la composition optimale du milieu est le milieu C-limitant contenant 40 ppm de Mn^{2+} (Fig. 41), et en FÉS, le milieu optimal est le milieu standard (60 mL de 1,5x concentré/20 g copeaux de bois) sans glucose, avec 0,375% d'huile d'olive (Tableau 10) correspondant à 0,35% d'huile dans le milieu standard. Les activités ligninases obtenues avec le milieu optimal en FÉL sont 1,111 U/ml pour LiP après 6 jours de fermentation et 4,75 U/ml pour MnP après 7 jours de fermentation (volume total de culture par flacon= 50 mL). Avec le milieu optimal en FÉS, les activités obtenues étaient de 0,28 U/mL pour LiP et de 2,5 U/mL pour MnP, après 21 jours de fermentation (volume total d'extrait liquide par boîte de culture= environ 25 mL pour 20 g de copeaux de bois et 40 mL pour 20 g de bois moulu).

Ces résultats indiquent que l'activité maximale de chaque type de ligninase (LiP et MnP) est beaucoup plus élevée et obtenue plus rapidement avec le milieu optimal de la FÉL que celui de la FÉS. De plus, les productivités en ligninases LiP (0,187 U/mL.jour) et MnP (0,679 U/mL.Jour) obtenues en milieu optimal FÉL (milieu optimal C-limitant) sont plus élevées que les valeurs obtenues respectivement avec le milieu optimal de la FÉS: 0,013 U/mL.Jour et 0,119 U/mL.Jour (voir tableau 11 pour comparaison des meilleurs résultats obtenus en FÉL et FÉS).

Donc, nous concluons à partir de ces résultats que même si le milieu optimal de la FÉS semble attrayant pour sa simplicité et pour sa faible demande en ingrédients, la production est cependant trop lente et insuffisante pour une production de ligninases à grande échelle. À l'inverse, le milieu optimal en FÉL est beaucoup plus performant puisque il permet la production d'activités ligninases beaucoup plus élevées, et plus rapidement.

Tableau 11

Comparaison des meilleurs résultats obtenus en fermentation à l'état liquide (FÉL) et en fermentation à l'état solide (FÉS) sur la production de ligninases avec *P. chrysosporium* (ATCC-24725):

MILIEU	Activités ligninases (U/mL)	PRODUCTIVITÉ** (U/mL. Jour)
FÉL		
Milieu standard optimal (30°C, aération=air, 1/2 x conc. std. inoc.)	LiP= 1,486 (8)* MnP= 0,500 (7)	LiP= 0,186 MnP= 0,071
Milieu C-limitant optimal ([Mn]=40 ppm)	LiP= 1,111 (6) MnP= 4,75 (7)	LiP= 0,185 MnP= 0,679
FÉS		
60 milieu std.(1,5x conc.) /20 g copeaux de bois. ([Mn]=40 ppm, huile canola= 0,375%(v/v), glucose= 0%)	LiP= 0,28 (21) MnP= 2,5 (21)	LiP= 0,013 MnP= 0,119

* Les valeurs entre parenthèses indiquent le nombre de jours d'incubation.

**La productivité est calculée en unités d'activité LiP ou MnP par mL.Jour d'incubation.

5. RAPPEL DES OBJECTIFS DE CETTE ÉTUDE:

Dans cette étude, nous nous sommes rendus-compte dès le départ de la difficulté de produire des ligninases avec *Phanerochaete chrysosporium* (ATCC-24725) en milieux synthétiques (milieu Kirk limitant en azote) à base de glucose comme source de carbone et d'énergie. En effet, dans la littérature, les activités rapportées à ce jour se sont avérées trop faibles et les tentatives de production à grande échelle se sont avérées sans grand succès avec ce microorganisme. Donc la production s'est révélée insuffisante pour diverses applications potentielles des ligninases à l'échelle industrielle.

C'est pourquoi nous avons effectué diverses modifications à partir de ce milieu non seulement pour augmenter la production de ligninases, mais aussi pour obtenir des activités facilement reproductibles, et d'augmenter l'échelle de production de ligninases.

Parmi les modifications majeures effectuées, l'utilisation d'une matière lignocellulosique abondante et renouvelable: les copeaux de bois, dans le milieu de culture fut une idée intéressante, puisque ce substrat naturel du fungus s'est avéré avoir un effet positif dans la production d'activités élevées en ligninases. Donc, notre étude de l'effet des différents paramètres sur la production de ligninases s'est réalisée avec un milieu à base de copeaux de bois.

À partir des résultats obtenus de cette étude, nous avons pu mettre au point un milieu optimal sans glucose, et à base de copeaux de bois comme source principale de carbone et d'énergie, et ce, sous des conditions atmosphériques d'air. Ce milieu a l'avantage d'être plus économique que les milieux rapportés à ce jour, en plus de valoriser l'utilisation de la biomasse. Les activités totales en ligninases obtenues avec ce nouveau milieu sont déjà plus élevées que toutes celles connues à ce jour dans la littérature avec le même microorganisme. En plus de permettre des niveaux d'activités plus élevés en ligninases, ce milieu nous a permis d'augmenter l'échelle de production de ligninases en volume de culture de 3 litres dans un mini-fermenteur artisanal de 4 litres, tout en permettant une productivité aussi élevée en ligninases, ce qui n'a jamais pu être concevable en fermentation conventionnelle.

À ce stade, un milieu optimal utilisant les copeaux de bois pour la production de ligninases avec *P. chrysosporium* a donc été mis au point. Cependant, des améliorations sont toujours sollicitées afin de rendre ce milieu encore plus performant par des modifications découlant de l'étude de nouveaux paramètres (exemple: effet de l'utilisation de diverses sources de lignocelluloses) ou de l'étude plus poussée des paramètres déjà établis (exemple: étude de l'interaction entre plusieurs paramètres). De plus, un calcul du coût du milieu de culture, et des études ultérieures à l'échelle-pilote permettraient d'évaluer la rentabilité économique de ce procédé à l'échelle industrielle.

CONCLUSION

Les résultats obtenus dans cette étude ont démontré que l'utilisation de copeaux de bois (particulièrement d'une taille de 5 mesh), de sources d'azote organique, de polyéthylène-glycol 6000, de lipides (huiles végétales), d'un inoculum sous forme d'homogénat mycérial, d'une atmosphère d'air, et d'une température de 30°C, ont un effet positif sur la production des ligninases (lignine peroxydases et peroxydases manganèse-dépendantes) en fermentation liquide agitée avec le champignon basidiomycète *Phanerochaete chrysosporium* (ATCC-24725).

À partir de cette étude sur l'effet des divers paramètres de culture sur la production de ligninases, nous avons établi les conditions nous permettant de mettre au point un milieu optimal de production de ligninases. Il s'agit d'un milieu liquide limitant en carbone et à base de copeaux de bois comme source principale de carbone et d'énergie, dont la composition est la suivante (par litre de milieu):

Copeaux de bois	20 g
KH ₂ PO ₄	2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
CaCl ₂	0,1 g
(NH ₄) ₂ Tartrate	0,66 g
Soln. élém. trace	70 mL
Thiamine	1 mg
PEG 6000	2,5 g
Huile de canola	2,5 g
Alcool vératrylique	2,5 mM
[Mn]	40 ppm

Conditions: T°C=30, pH= 4.5, aération= air, agitation= 175 r.p.m., inoculum= homogénat mycérial 10% (v/v) de 1,65% (p/v) poids sec.

Ce milieu a l'avantage d'être plus économique (sans glucose) et de permettre la production d'activités ligninases LiP et MnP plus élevées que celles rapportées à ce jour avec le même microorganisme en milieux liquides synthétiques à base de glucose comme source de carbone, ce qui est un avantage important en vue d'une production à grande échelle de ligninases.

De plus, dans cette étude, nous avons observé que même si la fermentation à l'état solide semble être un procédé plus économique et plus simple que la fermentation à l'état liquide, les concentrations et quantités d'activité ligninase obtenues sont cependant trop faibles et le temps de fermentation nécessaire trop long pour être comparables à ceux obtenus en fermentation à l'état liquide.

À partir du milieu et des conditions optimales établies, une augmentation de l'échelle de production de ligninases en volume de culture de 3 litres (en mini-fermenteur artisanal de 4 litres) nous a permis d'atteindre des productivités en ligninases comparables à celles obtenues en flacons agités. À notre connaissance, aucune étude antérieure de production de ligninases en fermentation à grande échelle n'a permis d'atteindre des concentrations de ligninases comparables avec *P. chrysosporium* (ATCC-24725), dans un milieu aussi économique que notre milieu optimal à base de copeaux de bois comme source principale de carbone et d'énergie. Les objectifs de cette étude ont donc été atteints, et nous espérons que les connaissances

acquises dans cette étude contribueront à la valorisation de l'utilisation des lignocelluloses dans diverses applications biotechnologiques.

BIBLIOGRAPHIE

1. Addleman, K. et F. Archibald. 1993. Kraft pulp bleaching end delignification by dikaryons and monokaryons of *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 266-273.
2. Adler, E. 1977. Lignin chemistry: past, present, future. *Wood Science Technol.* 11: 169.
3. Agosin, E., J.-J. Daudin et E. Odier. 1985. Screening of white-rot fungi on ¹⁴C-lignin labeled and ¹⁴C-whole labeled wheat straw. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22: 132.
4. Ander, P. et K.-E. Eriksson. 1976. The importance of phenol oxidase activity in lignin degradation by white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Arch. Microbiol.* 109: 1-8.
5. Ander, P. et K.-E. Ericksson. 1978. "Lignin degradation and utilization by microorganisms". Dans: *Progress in Industrial Microbiology*, vol. 14.: Bull, M.J. (éd.), Elsevier, Amsterdam. p.1.
6. Anderson, L.A., V. Renegathan, A.A. Chiu, T.M. Loehr et M.H. Gold. 1985. Spectral characterization of diarylpropane oxygenase, a novel. peroxide-dependant heme enzyme. *J. Biol. Chem.* 260: 6080-6087.
7. Archibald, F.S. 1992 (a). Lignin peroxidase activity is not important in biological bleaching and delignification of unbleached kraft pulp by *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3101-3109.
8. Archibald, F.S. 1992 (b). A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye azure B. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3110-3116.
9. Asada, Y., M. Miyabe, M. Kikkawa et M. Kuwahara. 1987. An extracellular NADH-oxidizing peroxidase produced by a lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Ferment. Technol.* 65: 483-487.

10. Asther, M., G. Corrieu, R. Drapron et E. Odier. 1987. Effect of Tween 80 and oleic acid on ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium* INA-12. *Enzyme Microb. Technol.* 9: 245-249.
11. Asther, M., L. Lesage, R. Drapron, G. Corrieu et E. Odier. 1988 (a). Phospholipid and fatty acid enrichment of *Phanerochaete chrysosporium* INA-12 in relation to ligninase production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27: 393-398.
12. Asther, M., F. Tonon, G. Corrieu et E. Odier. 1988 (b). "Strategies to enhanced ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium*". Dans: *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation.* : Aubert, J.-P., P. Beguin et J. Millet (éds.), Academic Press. p. 333.
13. Barr, D.P., M.M. Shah, T.A. Grover et S.D. Aust. 1992. Production of hydroxyl radicals by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. and Biophys.* 298: 480-485.
14. Blanchette, R.A., T.A. Burnes, M.M. Eerdmans et M. Akhtar. 1992. Evaluating isolates of *Phanerochaete chrysosporium* and *Ceriporiopsis subvermispota* for use in biological pulping processes. *Holzforschung* 46: 109-115.
15. Bonnarne, P. et T.W. Jeffries. 1989. Mn(II) regulation of lignin peroxidases and manganese-dependant peroxidases from lignin degrading white-rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 210-217.
16. Bonnarne, P. et T.W. Jeffries. 1990. Mn(II) regulation of lignin peroxidases and manganese peroxidases from lignin-degrading white-rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 210-217.
17. Bonnarne, P., J. Perez et T.W. Jeffries. 1991. "Regulation of ligninase production in white-rot fungi". Dans: *Enzymes in Biomass Conversion*, chap. 16. : Leatham, G.F. et M.E. Himmel (éds.), ACS Symposium Series 460, Washington D.C. p. 200-206.

18. Bono, J.J., P. Goulas, J.F. Doe, N. Portet et J.L. Seris. 1990. Effect of Mn(II) on reactions catalysed by lignin peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. Eur. J. Biochem. 192: 189-193.
19. Bourbonnais, R. et M.G. Paice. 1988. Veratryl alcohol oxidases from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. Biochem. J. 255: 445-450.
20. Boyle, C.D., B.R. Kropp et I.D. Reid. 1992. Solubilization and mineralisation of lignin by white rot fungi. Appl. Environ. Microbiol. 58: 3217-3224.
21. Brown, J.A., J.K. Glenn et M. Gold. 1990. Manganese regulates the expression of manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. J. Bacteriol. 172: 3125-3130.
22. Bumpus, J.A., M. Tien, D. Wright et S.D. Aust. 1985. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white-rot fungus. Science 228: 1434.
23. Burdsall, H.H. et W.E. Eslyn. 1974. A new *Phanerochaete* with a *chrysosporium* imperfect state. Mycotaxon 1: 123-133.
24. Buswell, J.A., B. Mollet et E. Odier. 1984. Ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* under conditions of nitrogen sufficiency. FEMS Microbiol. Lett. 25: 295-299.
25. Cai, D. et M. Tien. 1989. On the reactions of lignin peroxidase compound III (isoenzyme H8). Biochem. Biophys. Res. Comm. 162: 464-469.
26. Chance, B. 1952. The spectra of the enzyme-substrate complexes of catalase and peroxidase. Arch. Biochem. Biophys. 41: 404.
27. Cherry, R.C. 1976. Dans: Biological Membranes, chap.3. : Chapman, D. et D.F.H. Wallach (éds.), Academic Press, N.Y. p. 47-102.

28. Crawford, D.L. et R.L. Crawford. 1976. Microbial degradation of lignocellulose: the lignin component. *Appl. Environ. Microbiol.* 31: 714.
29. Crawford, D.L. et R.L. Crawford. 1980. Microbial degradation of lignin. *Enzyme Micro. technol.* 2: 11.
30. Crawford, R.L. 1981. Dans: *Lignin Biodegradation and Biotransformation.* : John Wiley and Sons (éd.), N.Y.
31. Dhawale, S., S.S. Dhawale et D. Dean-Ross. 1992. Degradation of phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium* under ligninolytic as well as nonligninolytic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3000-3006.
32. Dobozi, M.S., G. Szakacs et C.V. Bruschi. 1992. Xylanase activity of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3466-3471.
33. Drew, S.W., K. Kadan, S.P. Schoemaker, W.G. Glaser et P. Hall. 1978. Chemical feedstocks and fuels from lignin. *AICHE Symp. Ser.* 74: 21.
34. Eaton, D.C. 1985. Mineralization of polychlorinated biphenyls by *Phanerochaete chrysosporium* : a ligninolytic fungus. *Enzyme Microb. Technol.* 7: 194.
35. Enoki, A. et M.H. Gold. 1982. Degradation of the diarylpropane lignin model compound 1-(3'4'-diethoxyphenyl)-1,3-dihydroxy-2-(4'-methoxyphenyl)-propane and derivatives by the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* . *Arch. Microbiol.* 132: 123.
36. Enoki, A., G.P. Goldsby, et M.H. Gold. 1980. Metabolism of the lignin model compounds veratryl alcohol β -guaiacyl ether and derivatives by *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* 125: 227.

37. Ericksson, K.-E., R.A. Blanchette et P. Ander. 1990. "Biodegradation of Lignin". Dans: Microbial and Enzymatic Degradation of wood and wood components. : Springer-Verlag KG, Berlin. p.225-333.
38. Faison, B.D. et T.K. Kirk. 1985. Factors involved in the regulation of a ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 49: 299-304.
39. Faison, B.D. et T.K. Kirk. 1983. Relationship between lignin degradation and production of reduces oxygen species by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. and Environ. Microbiol. 46: 1140-1145.
40. Fenn, P. et T.K. Kirk. 1979. Ligninolytic system of *Phanerochaete chrysosporium* : inhibition by o-phthalate. Arch. Microbiol. 123: 307-309.
41. Fenn, P. et T.K. Kirk. 1981. Relationship of nitrogen to the onset and suppression of ligninolytic activity and secondary metabolism in *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Microbiol. 130: 59-65.
42. Forney, L.J., A.C. Redy, M. Tien et S.D. Aust. 1982. The involvement of hydroxyl radical derived from hydrogen peroxide in lignin degradation by the white-roy fungus *Phanerochaete chrysosporium*. J. Biol. Chem. 257: 11455.
43. Forrester, I.T., A.C. Grabski, R.R. Burgess et G.F. Leatham. 1988. Mn-dependant peroxidases and the biodegradation of lignin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 157: 992-999.
44. Freudenburg, K. 1968. "The constitution and biosynthesis of lignin". Dans: Constitution and biosynthesis of Lignin. : Neish, A.C. et K. Freudenburg (ed.). Springer, N.Y. p. 49.
45. Fukui, H. 1992. Dechlorination and detoxification of bleach plant effluent by *Phanerochaete chrysosporium* . J. Biotech. 24: 267-275.

46. Fukuzumi, T., A. Yotukura et Y. Hayashi. 1983. "Screening the fungus for biological pulping". Dans: Abstracts of Recent Advances in Lignin Biodegradation Research: Fundamentals and Biotechnology. : May 31-June 2, Kyoto, Japan. p.33.
47. Glenn, J.K., M.A. Morgan, M.B. Mayfield, M. Kuwahara et M.H. Gold. 1983. "An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*". Dans: Biocatalysis in Agricultural Biotechnology, chap. 9. : Whitaker, J.R. et P.E. Sonnet (éds.). ACS Symposium series, no. 389, pp. 127-140.
48. Glenn, J.K. et M.H. Gold. 1985. Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependant peroxidase from lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Biochem. Biophys. 242: 329.
49. Gold, M.H. et M. Alic. 1993. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Microbial Rev. 57: 605-622.
50. Gold, M.H., M. Kuwahara, A.A. Chiu et J.K. Glenn. 1984. Purification and characterization of an extracellular H₂O₂-requiring diarylpropane oxygenase from the white-rot basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Biochem. Biophys. 234: 353-362.
51. Gold, M.H., H. Wariishi, L. Akileswaran, Y. Mino et T.M. Loehr. 1987. "Spectral characterization of Mn-peroxidase, an extracellular heme enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*." Dans: Lignin enzymic and Microbial Degradation. : Odier, E. (éd.), INRA Publications, Versailles, France. p. 113-118.
52. Goldstein, I.S. 1975. Potential applications of bio-ligninolytic systems. Science 189: 847.

53. Haemmerli, S.D., H.E. Schoemaker, H.W.H. Schmidt et M.S.A. Leisola. 1987. Oxidation of veratryl alcohol by the lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*, involvement of activated oxygen. FEBS Lett. 220: 149-154.
54. Haemmerli, S.D., M.S.A. Leisola, D. Sanglard et A. Fiechter. 1986. Oxidation of benzo(a)pyrene by extracelular ligninases of *Phanerochaete chrysosporium*. J. Biol. Chem. 261: 6900.
55. Hammel, K.E., M. Tien, B. Kalyanaraman et T.K. Kirk. 1985. Mechanisms of oxidative C α -C β cleavage of a model lignin dimer by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. J. Biol. Chem. 260: 8348.
56. Hammel, K.E., W.Z. Gai, B. Green et M.A. Moen. 1992. Oxidative degradation of phenanthrene by the ligninolytic fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 58: 1832-1838.
57. Harvey, P.J., H.E. Shoemaker, R.M. Bowen et J.M. Palmer. 1985. Single-electron transfer processes and the reaction mechanism of enzymatic degradation of lignin. FEBS Letters 183: 13-16.
58. Harvey, P.J., H.E. Schoemaker et J.M. Palmer. 1986. Veratryl alcohol as a mediator and the of radical cations in lignin biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Lett. 195: 242-246.
59. Harvey, P.J., H.E. Schoemaker et J.M. Palmer. 1987. "Mechanisms of ligninase catalysis". Dans: Proc. Int. Seminar on Lignin, Enzymatic and Microbial degradation. : 23-24 April 1987, INRA, Paris (Les Colloques de l'INRA, no. 40), pp. 145-150.
60. Harvey, P.J., J.M. Palmer, H.E. Schoemaker, H.L. Dekker et R. Wever. 1989. Pre-steady-state kinetic study on the formation of compound I and II of ligninase. Biochim. Biophys. Acta 994: 59-63.

61. Hatakka, A.I. et A.K. Uusi-Rauva. 1983. Degradation of ¹⁴C labaled poplar wood lignin by selected white-rot fungi. *Eur. J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 235.
62. Hatakki, A.I. 1983. Pretreatment of wheat straw by white-rot fungi for enzymatic saccharification of cellulose. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18: 350.
63. Higuchi, T. 1982. Biodegradation of lignin. *Experientia.* 38: 159.
64. Higuchi, T. 1985. "Degradative pathways of lignin model compounds". Dans: *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components*, chap. 20. : Acad. Press, N.Y.
65. Huynh, B.B., H.-m. Chang, T.W. Joyce et T.K. Kirk. 1985. Dechlorination of chloro-organics by a white-rot fungus. *Tappi J.* 7: 96.
66. Huynh, V.-B et R. D. Crawford. 1985. Novel extracellular enzymes (ligninases) of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol. Letters* 28: 119-123.
67. Jäger, A., S. Croan et T.K. Kirk. 1985. Production of ligninases and degradation of lignin in agitated submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 1274-1278.
68. Janshekar, H. et A. Fiechter. 1983. "Lignin: biosynthesis, applications, and biodegradation". Dans: *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology.* : Fiechter, A. (éd.) Springer-Verlag, Berlin. 27: 119.
69. Janshekar, H. et A. Fiechter. 1988. Cultivation of *Phanerochaete chrysosporium* and production of lignin peroxidases in submerged stirred tank reactors. *J. Biotechnol.* 8: 97-112.
70. Janshekar, H., T. Haltmeier et C. Brown. 1982. Fungal degradation of pine and straw alcali lignins. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 14: 174-181.

71. Jeffries, P.J., S. Choi et T.K. Kirk. 1981. Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 290-296.
72. Bollag, J.M., K.L. Schuttleworth et D.H. Anderson. 1988. Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 3086-3091.
73. Jones, S.C. et D.M. Briedis. 1992. Adhesion and lignin peroxidase production by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* in a rotating biological contactor. *J. Biotechnol.* 24: 277-290.
74. Käppeli, O. 1976. Funktion und Bau der Zelloberfläche von *Candida tropicalis* bei der Assimilation von Kohlenwasserstoffen. Diss. ETH Zürich 5661.
75. Kern, H.W. 1984. Bacterial degradation of dehydropolymers of coniferyl alcohol. *Arch. Microbiol.* 138: 18.
76. Kersten, P.J., M. Tien, B. Kalyanaraman et T.K. Kirk. 1985. The ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* generates cation radicals from methoxybenzenes. *J. Biol. Chem.* 260: 2609.
77. Keyser, P.J., T. K. Kirk, et J.G. Zeikus. 1978. Ligninolytic enzyme system of *Phanerochaete chrysosporium*: Synthesized in absence of lignin in response to nitrogen starvation. *J. Bacteriology* 135: 790-797.
78. Kirk, T.K. 1981. "Toward elucidating the mechanisms of action of the ligninolytic systems in basidiomycetes". Dans: *Trends in the Biology of Fermentations for Fuels and Chemicals.* : Hollander, A. (éd.), Plenum press, N.Y. p.131.
79. Kirk, T.K. 1987. Lignin-degrading enzymes. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A.* 321: 461-474.
80. Kirk, T.K. et H.-m. Chang. 1981. Potential applications of bio-ligninolytic systems. *Enzyme Microb. Technol.* 3: 189.

81. Kirk, T.K. et R.L. Farrell. 1987. Enzymatic "combustion". The microbial degradation of lignin. *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 465-505.
82. Kirk, T.K. et P. Fenn. 1982. "Formation and action of the ligninolytic system in basidiomycetes". Dans: *Decomposer basidiomycetes, British Mycological Society Symposium 4.* : Frankland, A., L. Hedges et B. Swift (éds.), Cambridge University Press, p. 67-90.
83. Kirk, T.K. et F. Nakatsubo. 1983. Chemical mechanisms of an important cleavage reaction in the fungal degradation of lignin. *Biochem. Biophys. Acta.* 756: 376.
84. Kirk, T.K., W.J. Connors et J.G. Zeikus. 1976. Requirement for a growth substrate during lignin decomposition by two wood-rotting fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 192.
85. Kirk, T.K., W.J. Connors, R.D. Bleam, W.F. Hackett et T.G. Zeikus. 1975. Preparation and microbial decomposition of synthetic [¹⁴C]-lignins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 2515-2519.
86. Kirk, T.K., E. Schultz, W.J. Connors, L.F. Lorenz et J.G. Zeikus. 1978. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* 117: 277.
87. Kirk, T.K., S. Croan, M. Tien, K.E. Murtagh et R.L. Farrell. 1985, 1986 (a). Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: Effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. *Enzyme Microb. Technol.* 8: 27-32.
88. Kirk, T.K., S.C. Johnsrud et K.E. Eriksson. 1986 (b). Lignin degrading activity of *Phanerochaete chrysosporium* burds: comparison of cellulase-negative and other strains. *Enzyme Microbial Technol.* 8: 75-80.

89. Kirk, T.K., M. Tien, P.J. Kersten, M.D. Mozuch et B. Kalyanaraman. 1986 (c). Ligninase of *Phanerochaete chrysosporium*: mechanisms of its degradation of the non-phenolic arylglycerol β -aryl ether substructure of lignin. *Biochem. J.* 236: 279.
90. Kirk, T.K., M. Tien, P.J. Kersten, B. Kalyanaraman, K.E. Hammel et R.L. Farrell. 1990. Lignin peroxidase from fungi: *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in Enzymol.* 188: 159-161.
91. Kirkpatrick, N. et J.M. Palmer. 1987. Semi-continuous ligninase production using foam-immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. : Éd. INRA, Paris, Les Colloques de l'INRA 40: 191-195.
92. Kuila, D., M. Tien, J.A. Fee et M.R. Ondrias. 1985. Resonance raman spectra of extracellular ligninase: evidence for a heme active site similar to those of peroxidases. *Biochemistry* 24: 3394-3397.
93. Leatham, G.F. et T.K. Kirk. 1983. Regulation of ligninolytic activity by nutrient nitrogen in white-rot basidiomycetes. *FEMS Microbiol. Lett.* 16: 65-67.
94. Leisola, M.S.A., D.C. Ulmer et A. Fiechter. 1983 (a). Problem of oxygen transfer during degradation of lignin by *Phanerochaete chrysosporium*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17: 113-116.
95. Leisola, M.S.A., D.C. Ulmer, T. Haltmeier et A. Fiechter. 1983 (b). Rapid solubilization and depolymerization of purified kraft lignin by thin layers of *Phanerochaete chrysosporium*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17: 117.
96. Leisola, M.S.A., D.C. Ulmer et A. Fiechter. 1984 (a). Factors affecting lignin degradation in lignocellulose by *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* 137: 171.

97. Leisola, M.S.A., D.C. Ulmer, R. Waldner, et A. Fiechter. 1984 (b). Role of veratryl alcohol in lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biotechnol.* 1: 331.
98. Leisola, M.S.A. et A. Fiechter. 1985 (a). Ligninase production in agitated conditions by *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 29: 33-36.
99. Leisola, M.S.A. et A. Fiechter. 1985 (b). "New trends in lignin biodegradation". Dans: *Advances in Biotechnological Processes 5.* : CRC Press. p. 59-89.
100. Leisola, M.S.A., U. Thanei-Wyss et A. Fiechter. 1985. Strategies for production of high ligninase activities by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biotechnol.* 3: 97-107.
101. Linko, S. 1988 (a). Production and characterization of an extracellular lignin peroxidase from immobilized *Phanerochaete chrysosporium* in a 10-L bioreactor. *Enzyme Microb. Technol.* 10: 410-417.
102. Linko, S. 1988 (b). Continuous production of lignin peroxidase by immobilized *Phanerochaete chrysosporium* in a pilot scale bioreactor. *J. Biotechnol.* 8: 163-170.
103. Linko, Y.-Y, M. Leisola, N. Lindholm, J. Troller, P. Linko et A. Fiechter. 1986. Continuous production of lignin peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biotechnol.* 4: 283-291.
104. Linko, S., L.-C. Zhong, M. Leisola, Y.-Y. Linko, A. Fiechter et P. Linko. 1987. Lignin peroxidase production by immobilized *Phanerochaete chrysosporium* in repeated batch shake cultures. : Éd. INRA, Paris, *Les Colloques de l'INRA* 40: 209-213.
105. Lowry, O.H., N.H. Rosebrough, A.L. Farr et R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

106. Lundkist, K., T. K. Kirk et W.J. Connors. 1977. Fungal degradation of Kraft lignin and lignin sulfonates prepared from synthetic ^{14}C -lignins. *Arch. Microbiol.* 112: 291.
107. Mandels, G.R. 1965. "Kinetics of fungal growth". Dans: *The fungi*, vol. I, *The fungal cell*. Ainsworth and Sussman (éd.).
108. Mandels, M., R. Andreotti, et C. Roche. 1976. Measurement of saccharifying cellulases. *Biotechnol. and Bioeng. Symp.* 6: 21-33.
109. Merrill, W. et F.B. Cowling. 1966. Role of nitrogen in wood deterioration: amounts and distribution of nitrogen free stems. *Can. J. Bot.* 44: 1555.
110. Nakatsubo, F., I.D. Reid, et T.K. Kirk. 1982. Incorporation of $^{18}\text{O}_2$ and absence of stereospecificity in primary product formation during fungal metabolism of a lignin model compound. *Biochem. Biophys. Acta*, 756: 376.
111. Odier, O. et M. Delattre. 1990. Multiple lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* INA-12. *Enzyme Microb. Technol.* 12: 447-452.
112. Paice, M.G., I.D. Reid, R. Bourbonnais, F.S. Archibald et L. Jurasek. 1993. Manganese peroxidase, produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching, demethylates and delignifies kraft pulp. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 260-265.
113. Palmer, J.M., P.J. Harvey et H.E. Schoemaker. 1987. The role of peroxidases, radical cations and oxygen in the degradation of lignin. *Phil. Trans. R. Soc. London A* 321: 495-505.
114. Paszczynski, A., V.-B. Huynh et R. Crawford. 1985. Enzymatic activities of an extracellular manganese-dependant peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 29: 37-41.

115. Paszczyński, A., V.-B. Huynh et R. Crawford. 1986. Comparison of Ligninase-1 and Peroxidase-M2 from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Biochem. Biophys. 244 (no. 2): 750.
116. Paterson, G.L. 1979. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. Anal. Biochem. 100: 201-220.
117. Perez, J. et T.W. Jeffries. 1990. Mineralization of $^{14}\text{CO}_2$ -ring-labeled synthetic lignin correlates with the production of lignin peroxidase, not of manganese peroxidase or laccase. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1806-1812.
118. Perez, J. et T.W. Jeffries. 1992. Roles of manganese and organic acid chelators in regulating lignin degradation and biosynthesis of peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2402-2409.
119. Petroski, R.J., W. Peczyńska-Czoch et J.P. Rosaza. 1980. Analysis, production, and isolation of an extracellular laccase from *Polyporus anceps*. Appl. Environ. Microbiol. 40: 1003-1006.
120. Pettey, T.M. et D.L. Crawford. 1984. Enhancement of lignin degradation in *Streptomyces* spp. by protoplast fusion. Appl. Environ. Microbiol. 47: 439.
121. Polvinen, K., P. Lehtonen, M.S.A. Leisola et K. Visuri. 1991. "Pilot-Enzymes in Biomass Conversion. Chap. 18. : Leatham, G.F. et M.E. Himmel (éds.), ACS Symposium Series 460, Washington D.C. p. 225-235.
122. Popp, J., B. Kalyanaraman et T.K. Kirk. 1990. Lignin peroxidase oxidation of Mn(II) in the presence of veratryl alcohol, malonic or oxalic acids and oxygen. Biochemistry 29: 10475-10480.

123. Reed, G.H. 1986. "Manganese in metabolisms and enzyme function". Dans: Manganese: an overview of chemical properties. : Schramm, V.L. et F.C. Wedler (éds.), Academic Press Inc. (London), Ltd., London. p. 313-355.
124. Reese, E.T. et A. Maguire. 1969. Appl. Microbiol. 17: 242-245.
125. Reid, I.D. 1983. Effects of nitrogen supplements on degradation of aspen wood lignin and carbohydrate components by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 45: 830-837.
126. Reid, I.D. 1989. Solid-state fermentations for biological delignification. Enzyme Microb. Technol. 11: 786-803.
127. Reid, I.D., L.E. Chao et P.S.S. Dawson. 1985. Lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium* in agitated cultures. Can. J. Microbiol. 31: 88-90.
128. Renegathan, V. et M.H. Gold. 1986. Spectral characterization of the oxidized states of lignin peroxidase, an extracellular heme enzyme from the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Biochemistry 25: 1626-1631.
129. Renegathan, V., K. Miki, et M.H. Gold. 1986. Role of molecular oxygen in lignin peroxidase reactions. Arch. Biochem. Biophys. 246: 155-161.
130. Rhodes, A. et D.L. Fletcher. 1966. Dans: Principals of Industrial Microbiology, chap. 6. : Pergamon Press, N.Y.
131. Rose, A.H. 1968. Dans: Chemical Microbiology, 2e édition, chap. 3. : Butterworth & Co. Publishers Ltd., London.
132. Sarkanen, K.V. 1971. "Precursors and their polymerization". Dans: Lignins: Occurrence, formation, structure and reactions. : Sarkanen, K.V. et C.H. Ludwig (éd.), Wiley -Interscience, N.Y. p. 95.

133. Sarkanen, K.V. et C.H. Ludwig. 1971. Dans: Lignins: Occurrence, formulation, structure, and reactions. : Wiley-Interscience, N.Y.
134. Schiesser, A., M. Luna, L. Trovatelli et G. Burla. 1989. effect of sunflower oil on growth and enzyme activities of *Pleurotus ostreatus* growing on straw in submerged culture. *Ann. Microbiol.* 39: 233.
135. Schimada, M., F. Nakatsubo, T.K. Kirk et T. Higuchi. 1981. Biosynthesis of the secondary metabolite veratryl alcohol in relation to lignin degradation in *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* 129: 321-324.
136. Schoemaker, H.E. et M.S.A. Leisola. 1990. Degradation of lignin by *Phanerochaete chrysosporium* (Minireview). *J. Biotechnol.* 13: 101-109.
137. Sodroski, J., C. Rosen, W.C. Goh. et W. Haseltine. 1985. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science* 228: 1434-1436.
138. Sowers, A.E. 1988. Effect of lipids on membrane fluidity. Dans: *Cell Fusion*. Plenum Press, N.Y.
139. Sundman, G., T.K. Kirk et H.-m. Chang. 1981. Fungal decolorization of kraft bleach plant effluent. *Tappi J.* 64: 145.
140. Takao, S.A. Yokota et M. Tanida. 1984. Development of useful abilities of microorganisms and successive conversion in fermentations using association of different kinds of microbes. *J. Ferment. Technol.* 62: 329-334.
141. Tien, M. 1987. Properties of ligninase from *Phanerochaete chrysosporium* and their possible applications. *Crit. Rev. Microbiol.* 15: 141-167.
142. Tien, M. et T.K. Kirk. 1983. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds. *Science* 221: 661-663.

143. Tien, M. et T.K. Kirk. 1984. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium* : purification, characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 2280-2284.
144. Tien, M. et T.K. Kirk. 1988. Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. Meth. of Enzymol. 161: 238-249.
145. Tien, M. et C.-P.D. Tu. 1987. Nature 326: 520-523.
146. Tien, M., T. K. Kirk, C. Bull et J.A. Fee. 1986. Steady-state and transient-state kinetics on the oxidation of 3,4 dimethoxybenzyl alcohol catalyzed by the ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* burds. J. Biol. Chem. 261: 1687.
147. Tonon, F., E. Odier, M. Asther, L. Lesage et G. Corrieu. 1988. Influence of medium additives for the production of active ligninase by *Phanerochaete chrysosporium*. Lignin Enzymic and Microbial Degradation, Paris 165: 165-170.
148. Tran, A.V. et P. Chambers. 1987. Delignification of an unbleached hardwood kraft pulp by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25: 484-490.
149. Turney, T.A. 1965. Oxidation mechanisms. : Butterworths & Co., London. p. 46-48.
150. Ulmer, D.C., M.S.A. Leisola, J. Puhakka, et A. Fiechter. 1983 (a). *Phanerochaete chrysosporium*: growth pattern and lignin degradation. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 18: 153.
151. Ulmer, D.C., M.S.A. Leisola, B.H. Schmidt et A. Fiechter. 1983 (b). Rapid degradation of isolated lignins by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 45: 1795.
152. Ulmer, D.C., M.S.A. Leisola et A. Fiechter. 1984. Possible induction of the ligninolytic system of *Phanerochaete chrysosporium*. J. Biotechnol. 18: 153-157.

153. Umegawa, T., F. Nakatsubo, et T. Higuchi. 1982. Lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium* : metabolism of a phenolic phenylcoumaran substructure model compound. Arch. Microbiol. 131: 24.
154. Venkatadri, R. et R.L. Irvine. 1990. Effect of agitation on ligninase activity and ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2684-2691.
155. Wariishi, H., L. Akileswaran et M.H. Gold. 1988. Manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Spectral characteristics and catalytic cycle. Biochemistry 27: 5365-5370.
156. Wariishi, H., H. B. Dunford, I.D. MacDonald et M.H. Gold. 1989. Manganese peroxidase from the lignin degrading *Phanerochaete chrysosporium*. Transient state kinetics and reactions mechanisms. J. Biol. Chem. 264: 3335-3340.
157. Wariishi, H., K. Valli et M.H. Gold. 1991. *In vitro* depolymerization of lignin by manganese peroxidase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 176: 269-275.
158. Wariishi, H., K. Valli et H. Gold. 1992. Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. J. Biol. Chem. 267: 23688-23695.
159. Weinstein, D.A., K. Krisnangkura, M.B. Mayfield et M.D. Gold. 1980. Metabolism of radiolabeled β -guaicyl ether-linked lignin dimeric compounds by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 39: 535-540.
160. Willershausen, H., H. Graf et A. Jäger. 1987. "Production of ligninases in stirred-tank fermenters". Dans: Lignin enzymatic and microbial degradation. : Éd. INRA, Paris, Les Colloques de l'INRA 40: 203-207.

161. Yadav, J.S. et C.A. Reddy. 1992. Non-involvement of lignin peroxidases and manganese peroxidases in 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol. Letters* 14: 1089-1092.
162. Yang, H.H., M.J. Effland et T.K. Kirk. 1980. Factors influencing fungal degradation of lignin in a representative lignocellulosic, thermomechanical pulp. *Biotechnol. Bioeng.* 22: 65.
163. Young, H.E. et V.P. Guinn. 1966. Chemical elements in complete mature trees of seven species in Maine. *Tappi J.* 49: 190-197.
164. Zeikus, J.G. 1981. "Lignin metabolism and the carbon cycle. Polymer biosynthesis, biodegradation and environmental recalcitrance". Dans: *Advances in Microbial Ecology.* : Marshall, K.C. (éd.), 6: 277.

Remerciements....

Au Dr. Devinder S. Chahal pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et dirigé mes travaux.

A Diane Rouleau pour son aide technique et sa courtoisie inestimables.

A Victor Awafo "dis-moi quelque chose" pour ses conseils utiles et pour son aide dans certains travaux, et sincères condoléances pour ta mère que tu a tant aimé.

Au Dr. Muhammed Ishaque pour m'avoir prêté de l'équipement et des produits chimiques de toutes sortes. Au personnel du centre informatique, ainsi qu'aux dames de la bibliothèque (Rosalia Agostino et Evelyne Rioux), pour tous leurs services rendus.

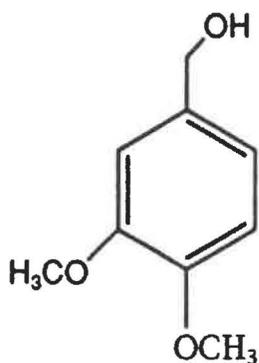
A tous ceux et celles qui, de n'importe quelle façon que ce soit, ont contribué à rendre ce projet réalisable et agréable.

Et à mes parents, pour leur support et leurs milliards de petits services qu'ils m'ont rendus depuis le tout début de ce projet.

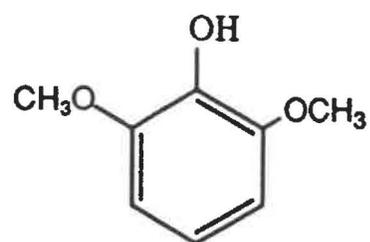
ANNEXE

**STRUCTURES DES COMPOSES UTILISES COMME REACTIFS
DANS LES ESSAIS ENZYMATIQUES POUR LA DETECTION
D'ACTIVITE LIGNINASE OU LACCASE.**

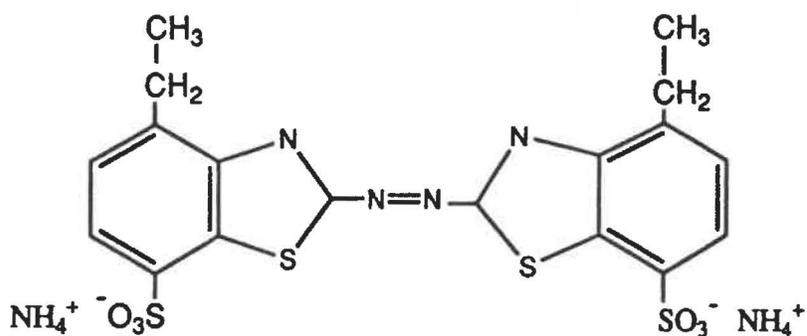
Alcool vératrylique
(3,4 diméthoxybenzyl alcohol)



2,6 Diméthoxyphénol



ABTS = 2,2-Azino-di-(3-éthyl benzthiazoline sulfonate (6))



Rouge de Phénol (Phénolsulfonphtaléine)

